

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**ANÁLISIS, INHIBICIÓN E INGESTA DE NUEVOS
CONTAMINANTES QUÍMICOS DE PROCESADO EN ALIMENTOS**

**TESIS DOCTORAL DE:
GEMA ARRIBAS LORENZO**

**BAJO LA DIRECCIÓN DE:
FRANCISCO JOSÉ MORALES NAVAS**

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



**ANÁLISIS, INHIBICIÓN E INGESTA DE NUEVOS
CONTAMINANTES QUÍMICOS DE PROCESADO EN
ALIMENTOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Gema Arribas Lorenzo

Bajo la dirección del doctor

Francisco José Morales Navas

Madrid, 2013



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química Analítica

Tesis Doctoral

**ANÁLISIS, INHIBICIÓN E INGESTA DE NUEVOS CONTAMINANTES QUÍMICOS DE
PROCESADO EN ALIMENTOS**

Gema Arribas Lorenzo

Madrid, 2013

Dirigida por:

Dr. Francisco José Morales Navas

Realizada en:



Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), CSIC

En colaboración con:



Laboratorio de Salud Pública de Madrid



Dr. Francisco José Morales Navas, Investigador Científico del Departamento de Caracterización, Calidad y Seguridad del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

HACE CONSTAR: que el presente trabajo de investigación titulado “Análisis, Inhibición e Ingesta de Nuevos Contaminantes Químicos de Procesado en Alimentos” ha sido realizado por la Licenciada en Química D^a Gema Arribas Lorenzo en este Departamento bajo mi dirección, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, a 4 de febrero de 2013

Fdo.: Dr. Francisco José Morales Navas

SEDE CIUDAD UNIVERSITARIA:

C/ JOSÉ ANTONIO NOVÁIS, 10
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 544 56 07 – 91 549 23 00
FAX: 91 549 36 27

SEDE JUAN DE LA CIERVA:

C/JUAN DE LA CIERVA, 3
28006 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 562 29 00
FAX: 91 564 48 53



ALCANCE: La gestión y ejecución de proyectos y contratos de investigación en el área de ciencia y tecnología de alimentos y nutrición.

.....

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a una beca predoctoral de Formación del Personal Investigador (FPI) concedida por la Conserjería de Educación de la Comunidad de Madrid y con la participación del Fondo Social Europeo (F.S.E.).

Diversas actividades recogidas en esta memoria han estado financiadas total o parcialmente por los siguientes proyectos/contratos de investigación:

- Proyecto de Excelencia Científica de la Comunidad de Madrid. *“Nuevas metodologías para el estudio y control de la seguridad y la calidad de los alimentos-ANALISYC”*, 2005-2009. (S-0505/AGR-0312).
- Proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia. *“Presencia de nuevos contaminantes químicos de procesado en alimentos”*, 2006-2007, (AGL2006-26025E/ALI).
- Proyecto intramural CSIC. *“Evaluación riesgo-beneficio de nuevas sustancias durante el horneado de cereales”*, 2009-2011, CSIC (2004470E611).
- Proyecto Europeo 6PM. *“Impeding neo-formed contaminants accumulation to reduce their health effects (ICARE)”*, 2006-2009, (COLL-CT-2005-516415).
- Proyecto Europeo 6PM de Acciones Concertadas. *“Thermally processed foods: possible health implications”*, 2004-2009, COST-927, European Science Foundation (ESF).

A mi familia

A José Luis

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido realizado en el departamento de Caracterización, Calidad y Seguridad del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (CSIC) bajo la dirección del Dr. Francisco J. Morales Navas al cual quiero expresar mi agradecimiento por haberme brindado la oportunidad de trabajar y aprender en su grupo de investigación, por su orientación, apoyo y dedicación. Mi gratitud por ayudarme en mi crecimiento profesional y personal.

Gracias a todas las personas del grupo de investigación con los que he tenido la oportunidad de coincidir a lo largo de todos estos años, Lola, Silvia, José A., Cristina, Saray, Julia... por el buen ambiente de trabajo. Ha sido un placer trabajar a vuestro lado.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, por las facilidades prestadas. Y a todo el personal que de una forma u otra han contribuido directa o indirectamente a la realización de este trabajo. Gracias especiales a Miguel A. Martínez, por su buena disposición a compartir los conocimientos del espectrómetro de masas (y de cualquier otro tema).

Me gustaría dar las gracias al Profesor Vincenzo Fogliano y a todos los componentes de su laboratorio, por el tiempo y la ayuda prestada.

Al Laboratorio de Salud Pública de Madrid. Todo el Capítulo 5 se ha realizado en sus instalaciones. Gracias en particular a Emiliano, Pilar y Alberto, por el buen trato que he recibido, siempre han estado dispuestos a ayudarme en todo lo posible. Me gustaría dar las gracias especialmente a Justina y a Julia. A Justina, por tomarse el tiempo necesario y leer detenidamente este trabajo, localizando errores que me habían pasado desapercibidos. A Julia, por ayudarme a entender mis marañas intelectuales con los cálculos y por ser una magnífica profesora del triple Q. A las dos, gracias por todo lo que habéis hecho por mi en los años transcurridos desde que tuve la suerte de encontraros. Gracias también a Montse, por regañarme para que me pusiera con la tesis y a Javi. A todas y cada una de las personas del Laboratorio, gracias.

A mis compañeros del Instituto, los que aún están por allí y los que no, M^a Carmen, Lucía, Begoña, Ana Granado, Laura Otero, Aylén, Sara B. ..., por compartir conmigo vuestro tiempo. Y

en especial a Paquita y a Pilar, me siento afortunada de teneros como amiga, mil gracias por todo vuestro apoyo y creer en mí.

A mis amigas del cole, Ele, Martón, Soni y Trichi. Este trabajo también os lo debo a vosotras, ya que esos momentos que hemos pasado juntas me han dado aire para continuar y tener siempre presente el Adelante, siempre Adelante...!. ¡Gracias chicas!.

Gracias también a mis amigas de la facultad, Ire, Paty, Isa y Mer, por estar siempre a mi lado.

Finalmente, a mis padres, hermano, abuelos y tito, cada uno de los cuales merecen solo una tesis de agradecimiento, porque sin vuestro cariño, apoyo y sacrificio diarios yo nunca hubiera llegado hasta aquí.




Y, a quien me hace feliz cada día, José Luis, por ayudarme con la tesis, por escucharme, animarme y tener paciencia. Te quiero.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AGEs	Productos avanzados de glicación
ALEs	Productos avanzados de lipoxidación
APCI	Ionización química a presión atmosférica
ARN	Ácido ribonucleico
Asn	Asparagina
BHT	Butil hidroxitolueno
CIAA	Confederación de Industrias Alimentarias de la UE, actualmente <i>Food and Drinks Europe</i>
CYP2E1	Citocromo P450 2E1 monooxigenasa
DAD	Detector de diodos
DG-SANCO	Dirección General de Salud y Consumidores de la Comisión Europea
2,4-DNPH	2,4-Dinitrofenilhidracina
ECD	Detector de captura electrónica
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
EH	Hidrolasa epóxido
ENAC	Entidad Nacional de Acreditación
ESI	Ionización por <i>electrospray</i>
FA	Ácido 2-furoico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FAPAS	<i>Food Analysis Performance Assessment Scheme</i>
FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos
FDCA	Ácido 2,5 furandicarboxílico
FFQ	Cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos
FURF	Furfural
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
Glu	Glucosa
GSH	Glutación
HMF	Hidroximetilfurfural
HMFA	Ácido 5-hidroximetil-2-furoico
HMFG	N-(5-hidroximetil-2-furoil)-glicina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HRTOF	Analizador de masas de alta resolución-tiempo de vuelo
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
ICTAN	Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición
IR	Infrarrojo
IRMM	Instituto de Referencia de Materiales y Medidas
JECFA	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios
JIFSAN	Instituto Mixto de Inocuidad de los Alimentos y Nutrición Aplicada
LC	Cromatografía de líquidos
LC-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LSP	Laboratorio de Salud Pública de Madrid

MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, actualmente Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAAM)
3-MCPD	3-Monocloropropano-1,2-diol
MOE	Margen de exposición
MRC	Materiales de referencia certificados
MRM	Monitorización de reacciones múltiples
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MSPD	Dispersión en matriz en fase sólida
m/z	masa/carga
N3-GA-Ade	N3-(2-carbamoyl-2-hidroxiethyl)adenina
N7-GA-Gua	N7-(2-carbamoyl-2-hidroxiethyl)guanina
OPD	Orto-fenilendiamina
OMS	Organización Mundial de la Salud
p.f.	Punto de fusión
PRM	Productos de la reacción de Maillard
Q-ToF	Cuadrupolo de tiempo de vuelo
%R	Recuperación (%)
RM	Reacción de Maillard
RMN	Resonancia magnética nuclear
RSD	Desviación estándar relativa
SCI	<i>Science Citation Index</i>
S/N	Señal/ruido
SIM	Monitorización de iones seleccionados
SMF	5-Sulfoximetilfurfural
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
SRM	Monitorización de reacciones seleccionadas
SULT	Sulfotransferasas
TOF-MS	Analizador de tiempo de vuelo acoplado a espectrometría de masas
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta
VIS	Visible

ÍNDICE

 I. OBJETIVOS	1
<hr/>	
 II. ESTRUCTURA DE LA MEMORIA	5
SUMMARY	11
<hr/>	
 III. INTRODUCCIÓN	15
A. Introducción general	17
B. Reacción de Maillard en alimentos	18
1. Aspectos generales	18
2. Química de la reacción de Maillard	18
3. Compuestos 1,2 dicarbonílicos	21
4. Consecuencias de la reacción de Maillard	23
4.1. Aspectos tecnológicos	23
4.2. Aspectos nutricionales	24
C. Contaminantes químicos de procesado en alimentos	27
1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos	28
2. Cloropropanoles y cloroésteres	28
3. Aminas heterocíclicas	29
4. Furano	30
5. Hidroximetilfurfural y acrilamida	31
D. Nuevos Contaminantes químicos de procesado en alimentos	32
1. Hidroximetilfurfural	32
1.1. Toxicología	32
1.1.1. Metabolismo	32
1.1.2. Toxicidad	33
1.1.3. Evaluación de riesgos	35
1.2. Mecanismos de formación	35
1.2.1. Reacción de Maillard	35
1.2.2. Caramelización	36
1.3. Métodos analíticos	37
1.4. Niveles en alimentos	39
1.5. Estimación de ingesta	41
1.6. Estrategias de mitigación	41
1.6.1. Selección de materia prima	42
1.6.6. Selección de variables de procesado	42
1.6.3. Eliminación tras el procesado	43
2. Acrilamida	44
2.1. Historia	44
2.2. Toxicología	45
2.2.1. Absorción, distribución, metabolismo y excreción	45

2.2.2. Toxicidad	47
2.3. Actividades en materia de regulación	56
2.3.1. Actividades de seguimiento de niveles de acrilamida	56
2.3.2. “Caja de herramientas” de la CIAA	57
2.3.3. Proyecto HEATOX	58
2.3.4. Valor señal	58
2.3.5. Organismos internacionales y otros	58
2.4. Mecanismos de formación	60
2.4.1. Reacción de Maillard	60
2.4.2. Rutas alternativas	63
2.5. Métodos analíticos	65
2.5.1. Extracción y purificación	65
2.5.2. Cromatografía de gases-espectrometría de masas	66
2.5.3. Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas	67
2.5.4. Otros métodos analíticos	68
2.5.5. Materiales de referencia certificados	75
2.6. Efecto de la tecnología del procesado	75
2.6.1. Influencia de la materia prima	75
2.6.2. Proceso de fritura	77
2.6.3. Proceso de horneado	78
2.6.4. Proceso de tostado	80
2.7. Cinética de formación-eliminación	81
2.8. Estrategias de mitigación	83
2.8.1. Precursores	83
2.8.2. Condiciones/métodos de procesado	84
2.8.3. Composición	85
2.9. Niveles en alimentos	90

IV. PARTE EXPERIMENTAL 95

Capítulo 1. Estudios sobre la influencia de los constituyentes del alimento y las condiciones de procesado 97

1.1. Contenido de acrilamida en alimentos españoles: estudio en productos de galletería y panadería. Efecto de la composición del alimento.	99
1.2. Influencia del proceso de fritura en la formación de acrilamida e hidroximetilfurfural en masas fritas.	101
1.3. Efecto de los compuestos fenólicos y del grado de oxidación del aceite en sistemas modelo de galleta.	103

Capítulo 2. Desarrollo de un método analítico para la determinación de glioxal y metilglioxal en galletas. Estudios sobre la influencia de compuestos dicarbonílicos en la formación de acrilamida e hidroximetilfurfural 105

2.1. Análisis, distribución y exposición dietética de glioxal y metilglioxal en galletas.	107
---	-----

Capítulo 3. Estudios de inhibición	109
3.1. Efecto de la piridoxamina en la formación de acrilamida en un sistema modelo glucosa-asparagina de baja humedad.	111
3.2. Mecanismo de acción del efecto inhibitor de la piridoxamina sobre la formación de acrilamida.	113
3.3. Aislamiento y caracterización estructural de los aductos acrilamida-piridoxamina.	115
Capítulo 4. Estudios de estimación de ingesta	117
4.1. Contribución de las patatas fritas de aperitivo a la exposición dietética a acrilamida en la población española.	119
4.2. Estimación de la ingesta en la población española de hidroximetilfurfural, y sustancias relacionadas, a partir del café.	121
Capítulo 5. Puesta a punto, validación y acreditación (norma UNE EN ISO/IEC 17025) de un método analítico para la determinación de acrilamida en alimentos	123
5.1. Objetivo	125
5.2. Introducción	125
5.2.1. Norma Internacional UNE EN ISO/IEC 17025	125
5.2.2. Validación del método analítico	125
5.3. Parte experimental	126
5.3.1. Optimización del método analítico	126
5.3.2. Optimización de los parámetros del espectrómetro de masas	126
5.3.3. Optimización de la separación cromatográfica	130
5.3.4. Metodología	134
5.3.5. Validación del método analítico	135
5.3.6. Muestras reales	143
5.3.7. Ensayos de aptitud	145
5.4. Acreditación	146

■ V. DISCUSIÓN INTEGRADORA **149**

Capítulo 1. Estudios sobre la influencia de los constituyentes del alimento y las condiciones de procesado	151
Capítulo 2. Desarrollo de un método analítico para la determinación de glioxal y metilglioxal en galletas. Estudios sobre la influencia de compuestos dicarbonílicos en la formación de acrilamida e hidroximetilfurfural	158
Capítulo 3. Estudios de inhibición	161
Capítulo 4. Estudios de estimación de ingesta	166

Capítulo 5. Puesta a punto, validación y acreditación (norma UNE EN ISO/IEC 17025) de un método analítico para la determinación de acrilamida en alimentos	172
--	-----

 VI. CONCLUSIONES	173
--	-----

 VII. ANEXOS	177
---	-----

Anexo I. Ejercicios de intercomparación	179
Anexo II. Publicaciones relacionadas	181

 VIII. BIBLIOGRAFÍA	191
--	-----

I. Objetivos

Las consecuencias directas de la aplicación del tratamiento térmico sobre los alimentos son, por una parte, las relativas a los aspectos básicos de higienización y prolongación de la vida útil de los mismos, y por otra, la inducción de una serie de modificaciones físico-químicas que ofrezcan al consumidor un producto más agradable. Sin embargo, las reacciones entre los constituyentes del alimento pueden dar lugar a una serie de nuevos compuestos que, no sólo tienen implicaciones en el aroma, sabor y color, sino que también poseen una determinada actividad biológica. Los compuestos generados tras un procesamiento térmico, es decir, que no estaban presentes en la materia prima original, y que pueden suponer un riesgo potencial para la salud, se denominan contaminantes químicos de procesado.

En los últimos años, dos nuevos contaminantes químicos de procesado, acrilamida e hidroximetilfurfural (HMF), han despertado un gran interés en la comunidad científica debido a sus efectos toxicológicos. Desde el descubrimiento en abril de 2002, de la presencia de acrilamida en diversos alimentos ricos en hidratos de carbono de alto consumo en la dieta occidental, se han llevado a cabo diferentes estudios con el fin de mitigar su formación durante el procesamiento. Por tanto, profundizar en el conocimiento de las variables y/o precursores, así como en el control de los parámetros tecnológicos de los procesos, resulta imprescindible para conocer los mecanismos implicados en su formación y para ofrecer base científica sólida tanto al sector empresarial como a las Agencias de Seguridad Alimentaria.

Al ser considerados tanto la acrilamida como el HMF como un riesgo potencial para la salud, y debido a la falta de datos existentes en la bibliografía sobre su exposición, resulta necesario realizar estudios de estimación de ingesta en la población. Estos estudios irán enfocados hacia los alimentos que contribuyen de manera significativa en la dieta española a su exposición, como son las patatas fritas en el caso de la acrilamida, y el café en el caso del HMF.

Esta Tesis tiene como objetivo general:

- **El estudio de los contaminantes químicos acrilamida e HMF en alimentos procesados térmicamente.**

Para lograr este propósito, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar los constituyentes del alimento así como el efecto de las principales variables que intervienen en el tratamiento térmico sobre la química de formación de acrilamida e HMF.
- Determinar la influencia de los precursores glioxal y metilglioxal en la formación de acrilamida e HMF.
- Evaluar el efecto inhibidor de la piridoxamina en la formación de acrilamida y elucidar el mecanismo de acción.
- Evaluar los niveles de acrilamida en diversos grupos de alimentos comercializados en España.
- Estimar la ingesta de acrilamida e HMF en la dieta española a través de sus dos principales fuentes de exposición: las patatas fritas y el café, respectivamente.
- Validar una metodología analítica para la determinación de acrilamida en alimentos horneados y fritos mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) a fin de que cumpla con los estándares de competencia técnica requeridos por la norma UNE EN ISO/IEC 17025, y obtener la acreditación por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC).

II. Estructura de la Memoria

Esta Memoria está dividida en ocho bloques. En el **Bloque I** se encuentran descritos los Objetivos de la Tesis Doctoral. A continuación, se describe la Estructura de la Memoria (**Bloque II**).

El **Bloque III**, correspondiente a la Introducción, se inicia con una breve descripción sobre la necesidad de evaluar los beneficios frente a las limitaciones o riesgos del procesado térmico de los alimentos desde el punto de vista tecnológico y nutricional. A continuación, se ofrece una visión global de la reacción de Maillard (RM), la principal reacción responsable en los alimentos de la formación de una gran variedad de compuestos entre los que se encuentran la acrilamida y el HMF, objeto central de esta Tesis. Y finalmente, se discute en detalle acerca de la toxicología, los mecanismos de formación, los métodos analíticos, las estrategias de mitigación y los niveles de estos dos contaminantes en los alimentos.

El **Bloque IV** describe la Parte Experimental. Ésta se divide en cinco Capítulos, correspondientes a los objetivos específicos, donde se incluyen los artículos científicos con los resultados obtenidos durante la realización de la Tesis Doctoral.

En el **Artículo 1.1** se describe la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) para llevar a cabo un estudio sobre la influencia de la composición de galletas y panes comercializados en España respecto al contenido de acrilamida. Estos productos, debido a que su consumo está ampliamente extendido en la población, podrían ser una fuente importante de exposición de acrilamida en la dieta española. Por lo tanto, también se presenta una relación entre el consumo de acrilamida y los diversos grupos poblacionales.

Además de la composición del alimento, las condiciones de procesado influyen en la formación de acrilamida e HMF. El **Artículo 1.2** centra su interés en los parámetros de temperatura y de tiempo de fritura en masas fritas (churros), y paralelamente estudia cómo se ven afectados otros aspectos importantes de la calidad del producto final, como el color y la humedad.

En el **Artículo 1.3** se presenta la influencia de la composición del aceite sobre la formación de acrilamida e HMF en una formulación convencional de galleta de desayuno. Se estudia el efecto de los compuestos fenólicos del aceite de oliva, además del efecto de la oxidación del aceite. El trabajo experimental incluido en este artículo fue desarrollado durante una estancia en la Università degli Studi di Napoli “Federico II” de Italia, bajo la supervisión del profesor Vincenzo Fogliano.

El **Artículo 2.1** describe el desarrollo de un método analítico basado en la cromatografía de líquidos de alta eficacia con detector ultravioleta (HPLC-UV), capaz de cuantificar los compuestos dicarbonílicos glioxal y metilglioxal en muestras de galletas, así como su posterior validación. Este trabajo resultó muy útil debido a la poca información existente en la bibliografía de los niveles de estos compuestos en galletas y porque son intermedios altamente reactivos en la formación de acrilamida (como se verá posteriormente en el Artículo 3.2).

El **Artículo 3.1**, el primero de los relativos al capítulo de inhibición, está dedicado al efecto de la vitamina B₆ en la química de formación de acrilamida. La piridoxamina es un inhibidor de la glicación proteica en sistemas biológicos. Numerosos trabajos previos han revelado su excelente capacidad para inhibir la formación de productos avanzados de glicación (AGEs) siendo uno de los mecanismos la reacción con los compuestos dicarbonílicos intermedios glioxal y metilglioxal. Este hecho estimuló nuestro interés en este vitámero B₆ como posible inhibidor de la formación de acrilamida ya que hasta el momento en que se desarrolló este trabajo no existía ningún estudio al respecto.

En base a los resultados obtenidos en el artículo anterior, el objetivo planteado en el **Artículo 3.2** fue estudiar si el mecanismo de acción de la piridoxamina implicado en la reducción de los niveles de acrilamida se produce a través del bloqueo de glioxal y metilglioxal. Para llevar a cabo este estudio fue necesario emplear el método de HPLC-UV desarrollado previamente en el Artículo 2.1.

Siguiendo el enfoque de los dos artículos anteriores y con objeto de investigar con más detalle el mecanismo mediante el cual la piridoxamina inhibe la formación de acrilamida, en el **Artículo 3.3** se estudia la reacción directa entre ambas sustancias así como la formación y la elucidación estructural de los correspondientes aductos.

Después de estudiar algunos de los factores que influyen en la formación de acrilamida e HMF así como posibles mecanismos de inhibición, resulta necesario conocer la ingesta de estos dos contaminantes químicos de procesado en la población española con el fin de proporcionar datos en una futura evaluación de riesgo. Las investigaciones se centran en las patatas fritas y en el café, como alimentos de referencia de ingesta de acrilamida e HMF, respectivamente.

En el **Artículo 4.1** se investiga la exposición dietética a acrilamida a través de las patatas fritas de aperitivo en base a datos de consumo de alimentos tanto del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA) como de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).

En el **Artículo 4.2** se estudia la contribución del café en la ingesta diaria de HMF. El HMF es un conocido marcador químico de la extensión del daño térmico en alimentos. Recientemente, se ha demostrado su bioactivación hacia su derivado genotóxico y mutagénico 5-sulfoximetilfurfural (SMF), incluyéndose por ello en el grupo de los nuevos contaminantes químicos de procesado. Este descubrimiento ha motivado a la comunidad científica a recopilar y actualizar la información sobre la ingesta de HMF a través de los alimentos con el fin de evaluar su riesgo. Este trabajo aborda por primera vez la situación de la ingesta de HMF a partir del café en España.

La parte experimental finaliza con la optimización y validación del método analítico para determinar acrilamida en alimentos mediante LC-MS/MS y posterior acreditación según la norma ISO 17025. Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Salud Pública de Madrid (LSP), con la colaboración de la Unidad de Técnicas Instrumentales y Contaminantes.

A continuación, en el **Bloque V**, se encuentra la Discusión Integradora. El conocimiento acerca de la formación de acrilamida e HMF, inhibición e ingesta, adquirido a lo largo de los cinco capítulos conduce a las Conclusiones más relevantes de este trabajo de investigación, recogidas en el **Bloque VI**. En el **Bloque VII**, se expone los resultados obtenidos en los diferentes ejercicios de intercomparación. Por último, se citan otros trabajos científicos relacionados con la presente Memoria y publicados en colaboración con otros centros de investigación extranjeros, un capítulo de libro y varios artículos de divulgación científica. Se finaliza con la Bibliografía en el **Bloque VIII**.

This Thesis is presented in manuscript format, and consists of eight parts. In the **Part I** and **Part II** are described the aim, objectives, and summary.

The aim of this work is the study of the chemical contaminants acrylamide and HMF in heat-processed food.

The **Part III** presents a background about food thermal processing, its benefits and risks from a technological and nutritional point of view, and introduces the concept of thermally generated food contaminants. In addition, a section is dedicated to the Maillard reaction since it is the main reaction responsible for the formation of acrylamide and HMF. Finally this section gets insight about toxicology, formation pathways, analytical methods, mitigation strategies and levels of these heat-induced contaminants in foods.

The **Part IV** deals with the development of experimental section. It was divided into five chapters, related to the main objectives, which include the scientific articles obtained during the course of this thesis.

The **Article 1.1** describes the LC-MS analytical procedure for the study of the influence of the composition of commercial biscuits and bread derivatives marketed in Spain on the acrylamide formation. These products, due to their relatively widespread consumption, could be a key source of acrylamide in the Spanish diet. Therefore, the relationship between acrylamide intake and population factors is presented.

Besides food composition, heat processing conditions also affects on the formation of acrylamide and HMF. The **Article 1.2** focuses on temperature and time frying parameters in fried dough (churros) and other attributes important for the final quality of product like colour and moisture content.

The purpose of **Article 1.3** is to investigate the effect of the olive oil phenolic compounds as well as of thermoxidized oil on the formation of acrylamide and HMF. The experimental work included in this paper was developed in the Dipartimento di Scienza degli Alimenti of University of Napoli "Federico II" (Portici, Italy).

In the **Article 2.1** an analytical method using HPLC with UV detection was developed to measure glyoxal and methylglyoxal in cookies with a posterior in-house validation. Further studies on these dicarbonyl compounds are necessary because they may provide new information about the dynamics of acrylamide and HMF in food and, subsequently, potential mitigation strategies. Moreover, knowledge of these reactive dicarbonyls in cookies, as well as their connection with acrylamide formation, has been limited, despite evidence indicating the important role they play in acrylamide genesis.

In the **Article 3.1**, the first one related to inhibition chapter, pyridoxamine is studied as a possible inhibitor of acrylamide. Pyridoxamine has been described as a post-Amadori inhibitor capable of inhibiting the formation of advanced glycation end-products in vivo and in vitro. The main purpose of this investigation was to evaluate whether this natural intermediate of vitamin B₆ could mitigate acrylamide formation in foods systems.

As a continuation of former research, the purpose of the **Article 3.2** is study if the reduction of acrylamide is closely associated to the inhibition rates of glyoxal and methylglyoxal by pyridoxamine. To determine the dicarbonyl compounds, it was used HPLC-UV according to the method previously developed in the Article 2.1.

Following the approach of two previous papers and to get further insight into the mechanism of pyridoxamine on reactions that involves acrylamide formation, the **Article 3.3** investigates a direct reaction between both compounds and characterizes and identifies its major products.

After the identification of several factors influencing or mitigating acrylamide and HMF formation as well as possible inhibition mechanisms, it is relevant to investigate dietary intake of these chemical process contaminants in the Spanish population, to obtain a picture of the current situation and to compare the intake with other European Union Member States before a further decision on risk management. The investigations focus on commercial potato crisps and ground and soluble coffee as the reference foods to the acrylamide and HMF daily intake, respectively.

The **Article 4.1** calculates the dietary exposure to acrylamide from potato crisps by using two different food consumption data base.

In the **Article 4.2** the dietary intake of HMF roasted coffee was studied. HMF is a classical chemical marker of the extent of the thermal treatment in food. HMF has attracted the attention of the scientific community in recent years because HMF has been shown to be converted in vivo to 5-sulfoxymethylfurfural (SMF), which is a genotoxic and mutagenic compound. Due to the new findings about HMF genotoxicity potential, compiling data in food and estimating consumer exposure to HMF is relevant for further discussions of food experts and risks managers. This investigation presents levels of HMF intake from coffee consumption in the Spanish population taking into account the partial contribution of ground and soluble coffee.

The analytical method development, optimization, validation and accreditation (ISO 17025) of acrylamide in food by LC-MS/MS is presented at the end of the experimental section. This work was development in the Laboratorio de Salud Pública de Madrid in cooperation with the Unidad de Técnicas Instrumentales y Contaminantes.

Consequently, the **Part V** describes the general discussion. The knowledge about acrylamide and HMF formation, inhibition and intake, acquired in previous chapters, finally leads to the formulation of the final conclusions (**Part VI**). References are found in **Part VII**. Finally, the **Part VIII** shows the successful participation in different interlaboratory comparison studies. Additionally, other research papers related to the thesis were published in cooperation with research centers at international level. It was also published a book chapter and several manuscripts for basic science dissemination.

III. Introducción

A. INTRODUCCIÓN GENERAL

El procesado de alimentos se puede considerar como el conjunto de prácticas que utilizan tecnologías y técnicas para transformar los alimentos crudos o productos intermedios en alimentos listos para el consumo (Lineback y Stadler, 2009). La salazón y el secado fueron dos de los primeros métodos utilizados por el hombre para transformar alimentos con el fin de preservarlos y mejorar su sabor. El procesamiento de los alimentos ha permitido avanzar en el abastecimiento alimentario al prolongar su vida útil y aumentar la variedad de los productos disponibles. Sin embargo, tanto los hábitos alimentarios como las técnicas de procesado de alimentos han ido evolucionando a lo largo de los años. Se ha pasado de cubrir meramente las necesidades basadas en la supervivencia del hombre, a cubrir las demandas que los ciudadanos plantean en las sociedades desarrolladas: calidad nutricional, sensorial y seguridad alimentaria.

El tratamiento térmico es uno de los procesos más ampliamente utilizados como método de preparación de los alimentos tanto en la industria alimentaria como en el hogar. La forma en la que el alimento es procesado, directamente sobre el fuego, hervido, asado, frito, etc., así como la temperatura y la duración del mismo influyen drásticamente sobre los cambios químicos y la naturaleza de los productos originados. Debido a este proceso, los constituyentes de los alimentos experimentan una serie de reacciones, muchas de las cuales son responsables del aroma, color, textura y sabor, pero otras están asociadas con la generación de compuestos potencialmente tóxicos. Aunque la presencia de estas sustancias tóxicas puede ser causa de alarma, siempre es necesario evaluar en un contexto amplio los beneficios y riesgos que presentan los alimentos procesados para llegar a una evaluación de riesgo eficaz y realista hacia la población. En este sentido, el Comité Científico de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) desarrolló una guía en el año 2010 cuyo propósito es la evaluación de los riesgos y beneficios de los alimentos con respecto a la salud humana (EFSA, 2010).

B. REACCIÓN DE MAILLARD EN ALIMENTOS

1. Aspectos generales

La RM ha sido reconocida durante más de 60 años como la principal ruta implicada en las propiedades organolépticas de los alimentos tratados térmicamente, y en general, en la aceptabilidad de los mismos (Kawamura, 1983). Se inicia por la condensación entre un grupo amino libre de un aminoácido, péptido o proteína y el grupo carbonilo de azúcares reductores o de lípidos oxidados. Posteriormente, y mediante una serie de reacciones complejas da lugar a los denominados, de manera genérica, productos de la reacción de Maillard (PRM). Los PRM están presentes en la mayoría de los alimentos que se consumen en la dieta de países occidentales. La RM es especialmente importante para la industria alimentaria, ya que se desarrolla durante los procesos de tostado, horneado o cocinado entre otros, confiriendo a los alimentos nuevos aromas, sabores y colores agradables para el consumidor (Hodge, 1967; Mottram, 1994).

Se estima que aproximadamente el 80-90% de los alimentos consumidos en los hogares son procesados en alguna medida, de ahí la importancia de considerar los efectos beneficiosos del tratamiento sobre la seguridad y la calidad de los productos (Van Boekel y col., 2010). Aparte de su influencia en las propiedades organolépticas, la RM está implicada en otros aspectos entre los que se incluyen el deterioro de los alimentos durante su procesado y almacenamiento y el efecto protector de determinados PRM con propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Sin embargo, la RM también está implicada en la formación de sustancias perjudiciales, como las aminas heterocíclicas o el furano que se describen en el siguiente capítulo, así como en la formación de HMF y acrilamida, objeto de estudio en la presente Memoria.

2. Química de la reacción de Maillard

La RM fue descrita por primera vez en 1912 por el químico francés Louis Camille Maillard (Maillard, 1912). Sin embargo, fue John Hodge quien en 1953 propuso por primera vez un

esquema de las etapas de esta compleja reacción (Hodge, 1953). La RM puede dividirse en tres etapas:

Etapla inicial: Comienza con una reacción de condensación entre el grupo carbonilo, normalmente de un azúcar reductor, aunque también puede ser un compuesto carbonílico generado en la etapa intermedia de la RM o procedente de la oxidación lipídica, y un grupo amino libre de un aminoácido, péptido o proteína originándose una base de Schiff (Figura 1). Por ciclación, la base de Schiff se transforma rápidamente en la glicosilamina N-sustituida correspondiente. Cuando la base de Schiff es una aldosisilamina N-sustituida, se forma la 1-amino-1-deoxi-2-cetosa mediante la denominada reorganización de Amadori, siendo esta epata irreversible. Sin embargo, cuando la molécula es una cetosisilamina-N-sustituida se forma una 2-amino-2-deoxi-2-cetosa y se le conoce como reorganización de Heyns.

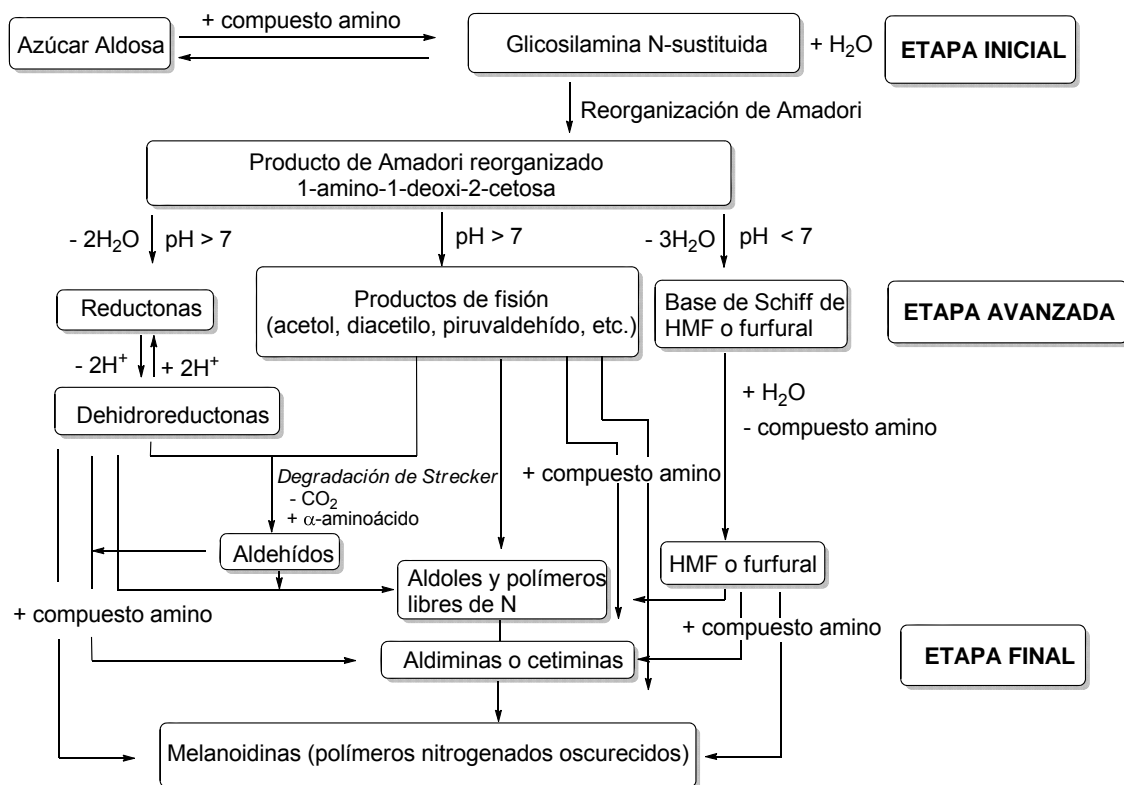


Figura 1. Esquema de la RM (Hodge, 1953; Martins y col., 2001; Zhang y Zhang, 2007).

Etapla avanzada: Los productos de Amadori y Heyns se descomponen dependiendo del pH, la actividad de agua, la presencia de metales divalentes o la temperatura, dando lugar a la formación de diferentes compuestos intermedios responsables del aroma que caracterizan a los alimentos cocinados. A pH neutro o ligeramente ácido, y en condiciones de baja actividad

de agua, la reacción predominante es una enolización-1,2 que da lugar a la formación de furfural cuando el azúcar reductor implicado es una pentosa o hidroximetilfurfural en el caso de una hexosa. Por el contrario, a pH básicos tiene lugar una enolización-2,3 formándose reductonas y una variedad de productos de fisión tales como acetol, piruvaldehído y diacetilo, todos ellos de gran reactividad, lo que hace que participen en nuevas reacciones con otros productos intermedios de la reacción (Figura 2).

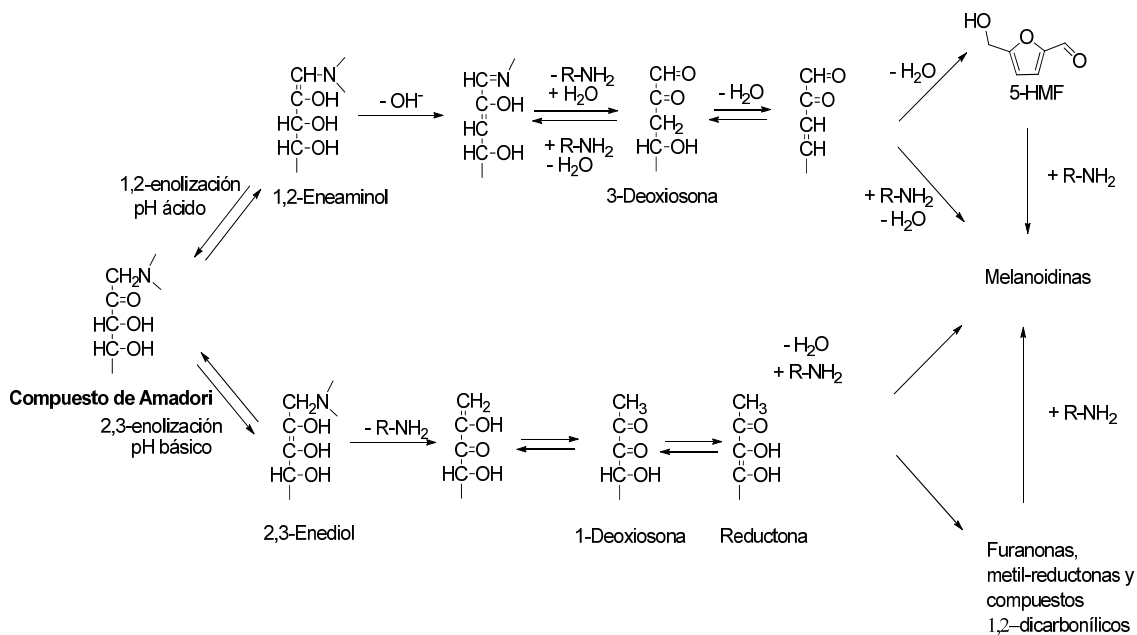


Figura 2. Esquema de las reacciones de enolización 1,2 y 2,3 dependiendo del pH (Hodge, 1967).

El producto de Amadori puede degradarse también vía oxidativa hacia compuestos carbonílicos (ruta de Namiki). Los compuestos dicarbonílicos producidos, mediante la degradación de Strecker (Figura 3) pueden reaccionar con aminoácidos y dar lugar a la formación de aldehídos con un carbono menos, α -aminocetonas, y eliminación de CO_2 . Estos aldehídos también juegan un papel importante en el aroma y sabor de los alimentos cocinados.

Etapas finales: Engloba un gran número de reacciones que incluyen ciclaciones, deshidrataciones, reorganizaciones y condensaciones originando dos clases diferentes de compuestos: los compuestos aromáticos volátiles, siguiendo la vía paralela de Strecker, y las melanoidinas.

Las melanoidinas son polímeros coloreados producidos por reacciones de condensación de compuestos con grupos amino procedentes de las etapas intermedias de la RM como pirroles

N-sustituidos, 2-formilpirroles N-sustituidos, y 2-furaldehído. La estructura de las melanoidinas varía dependiendo de las condiciones en las que haya tenido lugar la reacción así como del tipo de alimento, además, poseen menor solubilidad que los PRM de partida (Morales y col., 2012).

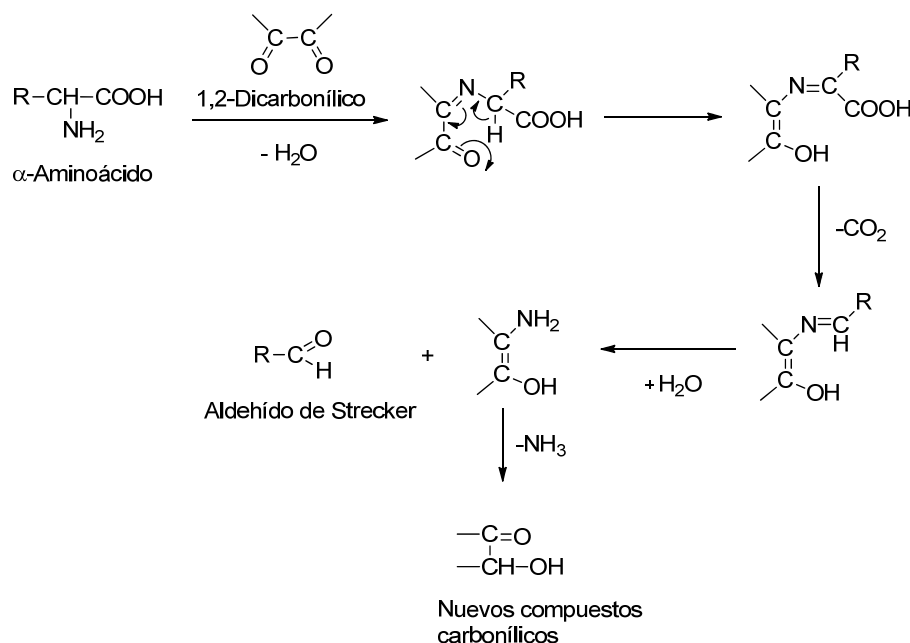


Figura 3. Degradación de Strecker (Ames, 1992).

3. Compuestos 1,2-dicarbonílicos

Los compuestos 1,2-dicarbonílicos se forman durante el calentamiento y/o almacenamiento prolongado de los alimentos, principalmente a partir de la autoxidación de la glucosa, la degradación del producto de Amadori o por fragmentación de las deoxiosonas. Este proceso ocurre principalmente en alimentos ricos en hidratos de carbono, y especialmente en monosacáridos donde la glucosa es más efectiva que la fructosa en la formación de compuestos dicarbonílicos (Hollnagel, 1998).

Los compuestos 1,2-dicarbonílicos son precursores tanto de los compuestos volátiles como de las melanoidinas. En la Figura 4 se muestran 11 compuestos dicarbonílicos que pueden formarse a partir de monosacáridos (Thornalley, 2005). Una de sus principales rutas de formación a través de la RM tiene lugar desde la forma 1,2-eneaminol del producto de

Amadori a intermedios deoxihexosonas (Thornalley, 2005). Una vía secundaria implica la conversión del 2,3-enediol al intermedio metil- α -dicarbonílico el cual sufre transformación a cetonas, aldehídos, furanos, pirroles, quinolinas e indoles, responsables del aroma de los alimentos.

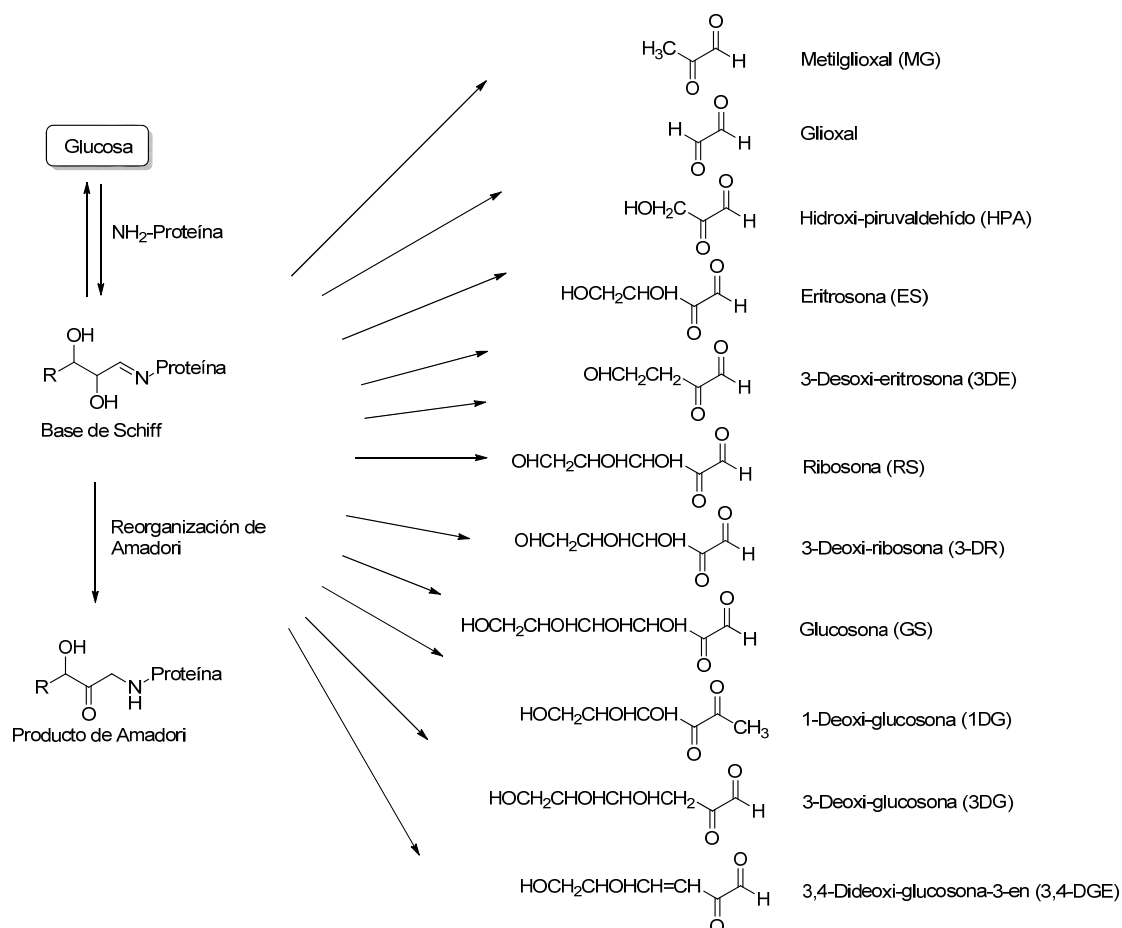


Figura 4. Compuestos 1,2-dicarbonílicos, intermedios de la RM (Thornalley, 2005).

A pesar del papel que desempeñan los compuestos 1,2-dicarbonílicos, existe poca información sobre los niveles de estos compuestos en los alimentos y en definitiva sobre su exposición a través de la dieta, probablemente debido a las dificultades que entraña la caracterización de estos intermedios. Los compuestos dicarbonílicos más estudiados son el glioxal y el metilglioxal, y se encuentran en productos como el pan, la salsa de soja, el té o el café tostado y en alimentos fermentados (Tabla 1).

Alimento o bebida	Glioxal	Metilglioxal	Referencia
Whisky	390 µg/L	1500 µg/L	Nagao y col., 1986
Brandy (manzana)	330 µg/L	320 µg/L	Nagao y col., 1986
Vino tinto	970 µg/L	570 µg/L	Nagao y col., 1986
Vino blanco	360-1509 µg/L		Barros y col., 1999
	2,15-12,72 mg/L	3,38-11,85 mg/L	Ferreira y col., 2007
Vino de Oporto	15,30-28-63 mg/L	15,67-25,40 mg/L	Ferreira y col., 2007
Cerveza	29 µg/L	123 µg/L	Saison y col., 2009
Café instantáneo	340 µg/L	1600 µg/L	Nagao y col., 1986
Café	870 µg/L	700 µg/L	Nagao y col., 1986
Té negro	20 µg/L	50 µg/L	Nagao y col., 1986
Té verde ^d	trazas	trazas	Nagao y col., 1986
Bebidas carbonatadas	20-1730 µg/L	71-1395 µg/L	Lo y col., 2008
Miel	1,7 mg/kg	3,1 mg/kg	Mavric y col., 2008
Miel de Manuka		651-1541 mg/kg	Stephens y col., 2010
Pan	300 µg/kg	790 µg/kg	Nagao y col., 1986
Tostadas	500 µg/kg	2500 µg/kg	Nagao y col., 1986
Salsa de soja	4900 µg/L	8700 µg/L	Nagao y col., 1986

Tabla 1. Niveles de glioxal y metilglioxal en algunos alimentos y bebidas.

4. Consecuencias de la reacción de Maillard

Hasta la década de los 80 del siglo pasado, la mayoría de las investigaciones realizadas sobre la RM se centraban en aspectos tradicionales de la ciencia y tecnología de los alimentos, incluyendo aroma, color, textura, trazabilidad, vida útil y valor nutricional. Sin embargo, en respuesta a la industria alimentaria y a los intereses de los consumidores, el impacto de la dieta en la salud ha recibido una mayor atención en los últimos años. Este hecho ha supuesto un cambio de perspectiva en la investigación de la RM para alcanzar nuevos conocimientos sobre la aplicación del tratamiento térmico sobre los alimentos con el fin de crear alimentos procesados más saludables, y a su vez, preservar las características sensoriales originarias.

4.1 Aspectos tecnológicos

Como se ha indicado anteriormente, el aroma es una de las principales consecuencias del desarrollo de la RM. La RM puede generar más de 2.500 compuestos aromáticos que se relacionan con las características sensoriales de los alimentos procesados térmicamente y que

inciden de manera especial en la aceptación del producto por parte del consumidor (Cerny, 2008). En general, la intensidad del aroma y el tipo de compuestos volátiles dependen de los precursores de reacción, de los parámetros del procesado térmico o del pH (Martins y col., 2001; Van Boekel, 2006). Algunos compuestos azufrados volátiles, relacionados con el aroma de la carne, pueden ser obtenidos por reacción entre la cisteína y un azúcar reductor. Por ejemplo, el glutatión, un tripéptido que contiene cisteína, contribuye a la generación del sabor de la carne (Wang y col., 2012). Se han identificado multitud de compuestos relacionados con el aroma en diversos alimentos procesados, como se puede observar en la Tabla 2.

Clase de compuesto	Aroma	Detectado en
Pirazinas	Cocinado, asado, tostado, cereales horneados	Alimentos calentados en general
Alquilpirazinas	Nueces, asado	Café
Alquilpiridinas	Amargo, astringente, quemado	Café, cebada, malta
Acilpiridinas	<i>Crackers</i>	Cereales
Pirroles	Cereal	Cereales, café
Furanos, furanonas, piranonas	Dulce, quemado, picante, caramelo	Alimentos calentados en general
Oxazoles	Nuez, dulce	Cacao, café, carne
Tiofenonas	Carne	Carne cocinada

Tabla 2. Aromas generados por diferentes compuestos derivados de la reacción de Maillard en alimentos tratados térmicamente (Van Boekel, 2006).

4.2. Aspectos nutricionales

Los trabajos publicados en la primera mitad del siglo XX muestran que las reacciones de pardeamiento pueden tener un efecto adverso sobre la calidad nutricional de las proteínas de los alimentos (McCollum y col., 1915; Greaves y col., 1938). Este efecto se debe al bloqueo de aminoácidos esenciales y en consecuencia, a una reducción en la disponibilidad biológica o incluso a la inhibición que ejercen determinados PRM sobre la actividad de las enzimas digestivas.

La lisina es el aminoácido comúnmente más reactivo hacia la RM y su pérdida de disponibilidad, pudiendo llegar hasta un 50%, es la consecuencia más significativa del progreso de la RM (Rerat y col., 2002). Esta consecuencia es importante en los alimentos en los cuales la lisina es el aminoácido limitante (Meade y col., 2005). Por ejemplo, Rufián-Henares y col. estimaron desde un 0,1 hasta un 36,7% el contenido de lisina no disponible en suplementos para deportistas a base de proteínas lácteas (Rufián-Henares y col., 2007). Durante el tratamiento térmico, se produce también la oxidación y la destrucción de otros aminoácidos esenciales como la metionina y el triptófano y la participación de los restos arginina e histidina en el entrecruzamiento de proteínas (Morales y col., 2007).

Las vitaminas también pueden verse afectadas por la RM. En muestras de leche infantiles se ha comprobado que las condiciones de almacenamiento promovieron la RM provocando pérdidas de determinadas vitaminas como la tiamina, el ácido pantoténico, y las vitaminas B₆ y B₁₂. En lo que a la vitamina C se refiere, es particularmente propensa a la degradación tanto durante el almacenamiento, debido a su alta susceptibilidad a la oxidación, como durante el tratamiento térmico generando diferentes compuestos, especialmente el furano. Sin embargo, en muestras de leche infantiles fortificadas no se observó ningún efecto significativo en la degradación de la vitamina C durante el almacenamiento (Gliguem y col., 2005).

El efecto de los PRM sobre la biodisponibilidad mineral se atribuye a su comportamiento como agentes quelantes de metales. En 1976, Hrdlicka observó que cuando sales de Fe³⁺ o Cu²⁺ se calientan junto a una mezcla de glucosa-glicina o fructosa-glicina originan pigmentos (melanoidinas) capaces de formar complejos estables con estos cationes, pudiendo influir en su biodisponibilidad (Hrdlicka, 1976). Del mismo modo, se ha comprobado en animales de experimentación y en humanos, que los PRM modifican la excreción urinaria del zinc y también de otros elementos como el cobre, hierro y calcio. En concreto, ensayos llevados a cabo en ratas, han mostrado la relación entre los PRM y algunos minerales como el calcio, magnesio (Delgado-Andrade y col., 2007a), zinc (Navarro y col., 2000), hierro y cobre (Hurrell, 1990).

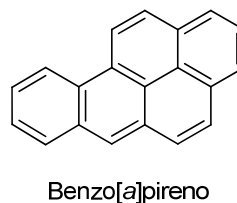
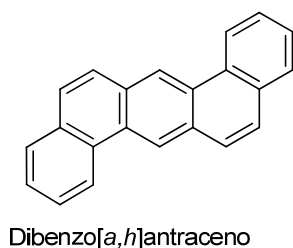
El tratamiento térmico produce cambios estructurales en las proteínas, lo cual provoca una menor solubilidad y una menor susceptibilidad a la acción de las enzimas digestivas. Además, determinados PRM pueden inhibir la actividad de la carboxipeptidasa A y aminopeptidasa N (Öste y col., 1986). En concreto, se ha descrito que el HMF es un inhibidor de la carboxipeptidasa A (Öste y col., 1987).

Los PRM, como las melanoidinas, son capaces de inhibir el crecimiento microbiano influyendo, de esta manera, en la vida útil de los alimentos (Rufián-Henares y Morales, 2007). Los primeros estudios fueron realizados utilizando sistemas modelo, constituidos por azúcares, aminoácidos y café. Daglia y col. demostraron que la actividad antibacteriana de las melanoidinas del café depende del grado de tueste y no del procedimiento aplicado para prepararlo (Daglia y col., 1994). Las melanoidinas pueden ejercer acción antimicrobiana mediante una actividad tanto bacteriostática como bactericida dependiendo de la concentración de melanoidinas, del pH y de la temperatura del medio, así como del peso molecular y la estructura de los PRM (Rufián-Henares y de la Cueva, 2009).

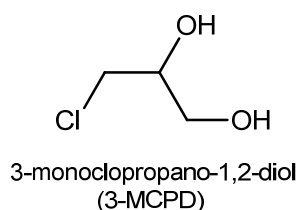
C. CONTAMINANTES QUÍMICOS DE PROCESADO EN ALIMENTOS

El empleo de altas temperaturas, en combinación con otros factores externos al alimento, además de reducir su valor biológico puede dar lugar a la formación de compuestos tóxicos que inciden en la seguridad del mismo. Estas sustancias se denominan contaminantes químicos de procesado. Son compuestos que no estaban presentes en el alimento fresco y cuya génesis está directamente relacionada con el procesado de los alimentos. En base a su toxicidad en modelos celulares y animales de experimentación, se estima que pueden ejercer efectos fisiológicos adversos en humanos, es decir, son sustancias que crean un riesgo potencial o real para la salud. Entre ellos destacan los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cloropropanoles y sus ésteres, así como los contaminantes derivados de la RM como las aminas heterocíclicas, el furano, el HMF y la acrilamida (Tabla 3).

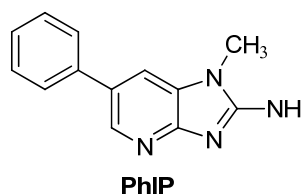
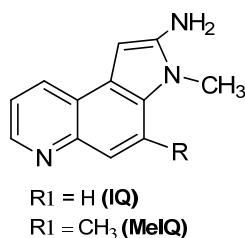
Hidrocarburos aromáticos policíclicos



Cloropropanoles



Aminas aromáticas



Furano

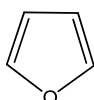


Tabla 3. Ejemplos de algunos contaminantes de procesado.

1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos políciclicos constituyen un grupo de más de cien compuestos que se caracterizan por poseer en su estructura dos o más anillos de benceno unidos entre sí. La mayoría contienen solamente carbono e hidrógeno y son siempre estructuras polinucleares de tipo aromático. Se forman por condensación de compuestos orgánicos tanto por pirólisis como por pirosíntesis. A altas temperaturas, los compuestos orgánicos se fragmentan fácilmente (pirólisis) y los radicales libres producidos se unen para formar compuestos aromáticos polinucleares estables (pirosíntesis) mediante reacciones tipo Diles-Alder. A temperaturas inferiores a 400 °C se forman en pequeñas cantidades, pero entre 400 y 1000 °C, los niveles producidos aumentan linealmente con la temperatura (Jägerstad y Skog, 2005). Entre los alimentos donde se han encontrado mayores niveles destacan la carne asada, el pescado ahumado, los quesos ahumados, curados y semicurados, el té y el café. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos se han incluido en las listas de contaminantes orgánicos prioritarios de la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (*Environmental Protection Agency*, EPA) (U.S. EPA, 2002) y de la Unión Europea (UE) (Commission Recommendation, 2005) debido a su actividad carcinogénica. Además el benzo[*a*]pireno, originalmente definido como probable carcinogénico en humanos (grupo 2A), ha sido recientemente clasificado como carcinogénico en humanos (grupo 1) (IARC, 2010).

2. Cloropropanoles y cloroésteres

Los cloropropanoles y los ésteres de sus ácidos grasos (cloroésteres) son contaminantes que se forman durante el procesado y elaboración de determinados alimentos e ingredientes. En 1978 el grupo de trabajo del profesor Velíšek fue el primero en demostrar que se formaban mediante hidrólisis ácida de la proteína vegetal hidrolizada (Velíšek y col., 1978). El 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD) es el cloropropanol de mayor presencia en esta proteína. Las proteínas vegetales hidrolizadas son un ingrediente muy utilizado en diversos alimentos como las salsas de soja, las sopas, las comidas preparadas, los aperitivos salados o los fideos instantáneos (Xu y col., 2006). Los cloropropanoles se han detectado también en otros alimentos que no son sometidos a hidrólisis ácida durante la fabricación. Entre dichos productos se encuentran la fruta y las hortalizas elaboradas, los productos a base de cereales y de panadería, las carnes procesadas, el pescado ahumado y la cerveza. También el 3-MCPD puede migrar de ciertos tipos de resinas resistentes a la humedad a base de epiclorohidrina,

utilizadas en cubiertas de papel y celulosa como por ejemplo cubiertas de salchichas, bolsitas de té y filtros de papel para el café. La presencia de cloropropanoles en los alimentos es preocupante debido a sus propiedades toxicológicas. En la UE se han fijado niveles máximos permitidos de 20 µg/kg para proteína vegetal hidrolizada y salsa de soja.

Los ésteres del 3-MCPD son ácidos grasos del 3-MCPD. Estudios recientes describen la presencia de estos compuestos en varios productos alimenticios, principalmente en aceites de oliva refinados y productos elaborados con estos aceites. Actualmente, no se dispone de suficiente información sobre su presencia en los alimentos ni sobre su toxicidad para poder evaluar su importancia sobre la salud. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los cloroésteres representan una nueva fuente de 3-MCPD en los alimentos, puesto que de ellos se puede liberar 3-MCPD *in vivo* por la reacción de hidrólisis catalizada por la enzima lipasa. Hamlet y col. encontraron este tipo de ésteres en cereales procesados y mostraron que podían ser generados como intermedios estables o como productos de formación a partir de mono y diacilglicerol (Hamlet y col., 2004).

Contaminantes químicos derivados de la reacción de Maillard

3. Aminas heterocíclicas

Las aminas aromáticas heterocíclicas son una familia de compuestos que han atraído el interés de muchos científicos debido a su posible relación con el cáncer. El descubrimiento realizado en 1977 por Sugimura y col. reveló que, en determinadas condiciones, el humo procedente del procesado y cocinado de alimentos ricos en proteínas contenía cantidades apreciables de sustancias mutagénicas (Sugimura y col., 1977). Actualmente, se han identificado más de 20 derivados de estas sustancias. Dependiendo del mecanismo de formación se pueden dividir en dos grandes grupos.

El primero, las carbolinas, se forma a elevadas temperaturas y se conocen como aminas pirolíticas. Se generan durante la pirólisis (> 250 °C) de aminoácidos (triptófano, ácido glutámico, fenilalanina y ornitina) o bien de proteínas (caseína y globulina de soja).

El segundo grupo son los aminoimidazoazarenos, llamados también aminos térmicos, los cuales han recibido una mayor atención por ser extremadamente mutagénicos en comparación con el primer grupo. Se forman en alimentos ricos en proteínas como la carne o el pescado a temperaturas inferiores a 300 °C. Las concentraciones encontradas en algunos tipos de alimentos se han recogido en diversos artículos de revisión (Felton y col., 2000; Skog y Solyakov, 2002).

Aunque existen grandes variaciones debido a las condiciones de cocinado o a los diferentes tipos de carne, en general, los valores más elevados corresponden a alimentos tratados a temperaturas elevadas y con un tiempo de cocción prolongado. Generalmente, los tipos de cocción (hervido o al vapor) que implican temperaturas alrededor de los 100 °C generan pocos agentes mutagénicos. Sin embargo, los tratamientos térmicos que suponen un calentamiento mediante procesos conductivos, como freír o asar, provocan un aumento de la actividad mutagénica. Algunos estudios también han identificado la presencia de estos compuestos en extractos de carne, condimentos y aromatizantes; así como en los residuos que quedan en las sartenes o las planchas después de la cocción, generalmente en las mismas cantidades que en el correspondiente alimento e incluso, en algunos casos, en concentraciones considerablemente más elevadas (Skog y col., 1998).

4. Furano

El furano es un compuesto que se forma durante el tratamiento de los alimentos con calor y contribuye a las propiedades sensoriales del producto. Se han propuesto múltiples mecanismos para su formación durante el tratamiento térmico, incluyendo la degradación de los derivados del ácido ascórbico, degradación de carbohidratos, degradación térmica de aminoácidos en presencia o ausencia de azúcares reductores, y oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides y ácidos orgánicos (Becalski y Seaman, 2005). Según el último Informe Científico de la EFSA sobre el furano, los alimentos que más contribuyen a la exposición humana a través de los alimentos son los potitos infantiles y el café (EFSA, 2011).

5. Hidroximetilfurfural y acrilamida

El estudio de los contaminantes en los alimentos ha crecido considerablemente en los últimos años convirtiéndose en una cuestión fundamental para el mantenimiento de la seguridad alimentaria a nivel mundial. Esto ha hecho que se descubran nuevos riesgos como es el caso del HMF y la acrilamida, considerados los más importantes contaminantes químicos de procesado en productos de panadería y galletería además del café, debido a su alto potencial toxicológico y a su concentración elevada en estos alimentos. Esta Tesis se centrará en estos dos nuevos contaminantes.

D. NUEVOS CONTAMINANTES QUÍMICOS DE PROCESADO EN ALIMENTOS

1. Hidroximetilfurfural

El HMF (5-hidroximetil-2-furaldehído; CAS No. 67-47-0) es un aldehído cíclico formado tanto a través de la RM como de la deshidratación de los azúcares (caramelización). El HMF está ampliamente distribuido en la dieta occidental y se ha identificado en una gran variedad de alimentos procesados. Su estructura así como algunas de sus características se presentan en la siguiente tabla.

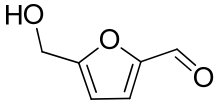
Estructura  $C_6H_6O_3$	Peso molecular	126,11 g/mol
	Punto de fusión	32-34 °C
	Solubilidad	agua, etanol, metanol, acetato de etilo
	Máximo absorbancia	284 nm

Tabla 4. Identificación, estructura y propiedades del HMF.

1.1. Toxicología

El tratamiento térmico así como el almacenamiento de los alimentos producen una serie de reacciones que conducen a compuestos que pueden afectar en la salud. A pesar de ser el HMF una sustancia conocida en la industria alimentaria y química desde hace décadas, la relación entre HMF y sus metabolitos, y la salud no se ha estudiado en detalle hasta el año 2006 (Glatt y Sommer, 2006).

1.1.1. Metabolismo

El HMF se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal de los roedores y se elimina con la misma rapidez de todos los tejidos, sin evidencia de una acumulación significativa. Sin embargo, su absorción puede estar influenciada por otros constituyentes de la dieta como es el contenido de fibra, el cual parece reducir el transporte y la absorción de HMF en las líneas celulares Caco-2 (Delgado-Andrade y col., 2008). El HMF es metabolizado para finalmente ser eliminado en la orina (~ 90%) y las heces (~ 10%). Además, se ha desarrollado un método para

.....

cuantificar los aductos de HMF a partir de aldehídos unidos como bases de Schiff al nitrógeno terminal de la hemoglobina. Dichos aductos pueden ser utilizados como biomarcadores de exposición (Davies y col., 2009).

La Figura 5 muestra las vías de biotransformación del HMF siendo la ruta principal la oxidación del HMF al ácido 5-hidroximetil-2-furanoico (HMFA) y la posterior formación del conjugado de glicina, N-(5-hidroximetil-2-furoil)-glicina (HMFG). El HMFA y el HMFG son los principales metabolitos del HMF excretados en la orina. Tanto en ratas como en humanos, la relación HMFA/HMFG disminuye a medida que aumenta la ingesta de HMF, lo que sugiere que la disponibilidad de glicina libre puede limitar la tasa de conjugación, y como resultado se produce la excreción de ácido furoico libre (FA) o de ácido 2,5 furandicarboxílico (FDCA) a través de una segunda ruta. Los ácidos HMFA, HMFG, y FDCA se han identificado en la orina de roedores y en la de los humanos, demostrando que estos ácidos se derivan del HMF de los alimentos. El HMF es biotransformado a SMF por sulfonación de su grupo funcional hidroxilo alílico, reacción catalizada por sulfotransferasas (SULT) (Glatt y Sommer, 2006; Surh y Tannenbaum, 1994). Es importante resaltar que en el año 2009, se detectó por primera vez el SMF *in vivo* en sangre de ratones (Monien y col., 2009).

Una ruta menor en la eliminación del HMF sería la oxidación completa de HMF a CO₂ a través de la apertura del anillo, formándose primero el ácido α -cetoglutarico. Esta vía se ha descrito en la literatura para roedores pero aún no se ha confirmado en humanos (Nomeir y col., 1992).

1.1.2 Toxicidad

Existen evidencias del efecto potencialmente nocivo del HMF basadas en ensayos *in vitro* y en experimentos realizados en animales de laboratorio. Sin embargo, cuando los estudios se extrapolan a los humanos, los resultados no son del todo concluyentes, siendo objeto de estudio en la actualidad. El SMF induce efectos genotóxicos y mutagénicos en bacterias y líneas celulares de mamíferos (Surh y col., 1994; Glatt y col., 2006). La interacción de este intermedio reactivo con nucleófilos celulares (ADN, ARN y proteínas) puede provocar daños estructurales en estas macromoléculas. En roedores, el HMF se ha identificado como iniciador y promotor del cáncer de colon, de procesos nefrotóxicos o de aberraciones cromosómicas (Zhang y col., 1993; Bakhiya y col., 2009).

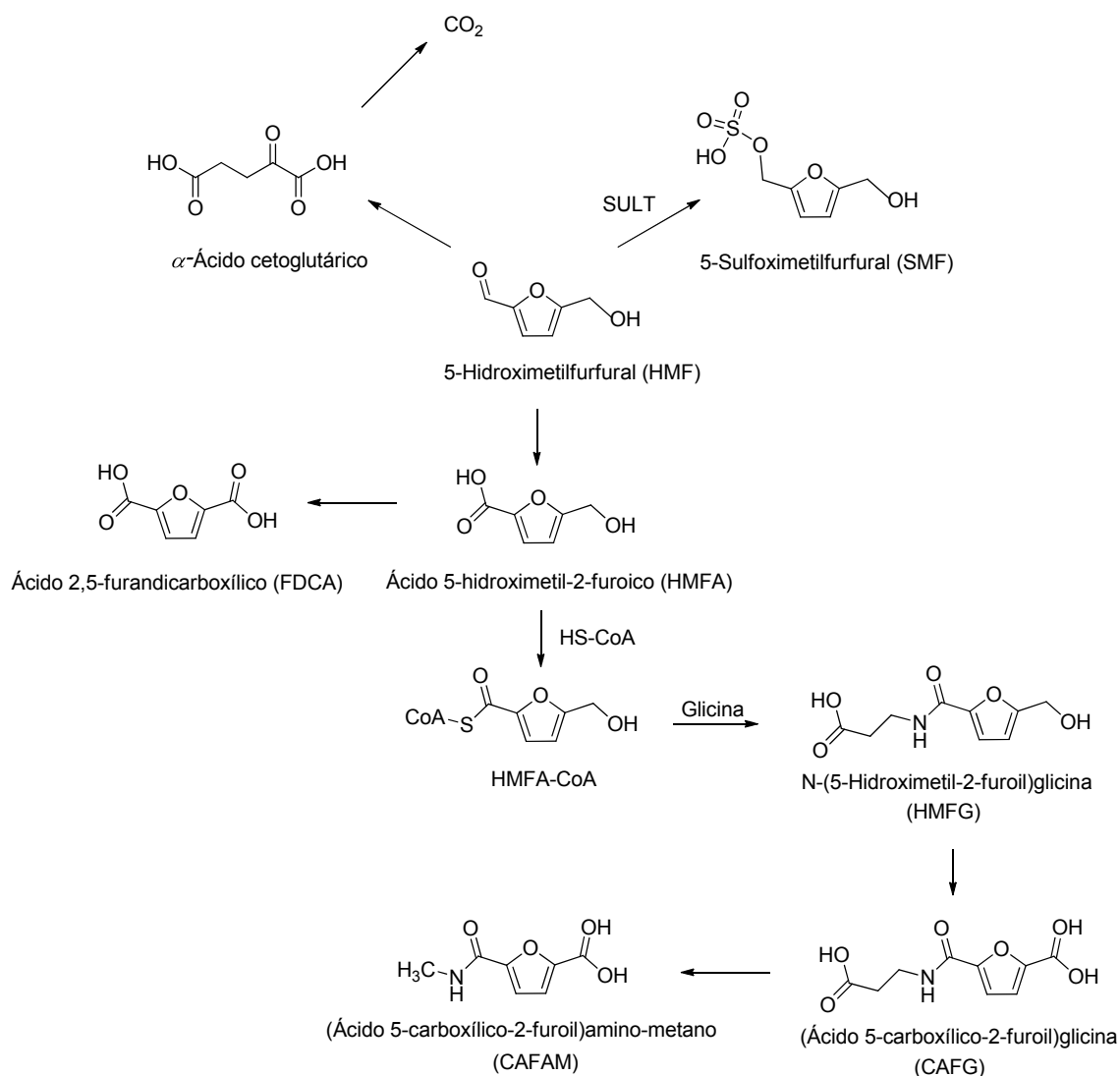


Figura 5. Metabolismo del 5-hidroxitetilfurfural (EFSA, 2005a).

La toxicidad aguda por vía oral del HMF como compuesto puro es relativamente baja, siendo la dosis letal (DL_{50}) de 2,5 g/kg de peso corporal en ratas (U.S. EPA, 1992). El Programa Nacional de Toxicología de Estados Unidos llevó a cabo un estudio durante 2 años encontrando que el HMF aumentaba la incidencia de adenomas hepatocelulares en ratones hembra de la línea B6C3F1. Sin embargo, no se ha encontrado evidencia científica de carcinogenicidad en ratas de la línea F344/N (NTP, 2008). Más tarde, el HMF ha demostrado ser un carcinógeno débil en ratones debido al aumento significativo del número de pequeños adenomas intestinales (Svendsen y col., 2009).

1.1.3. Evaluación de riesgos

En el año 2005, el comité científico de la EFSA estimó una ingesta diaria de HMF de 1,6 mg/persona (EFSA, 2005a). Este valor es muy superior al valor de 0,54 mg/persona/día calculado a partir de una amplia base de datos sobre estudios crónicos y subcrónicos realizados con animales (JECFA, 1996). Sin embargo la preocupación sobre el riesgo viene asociada por la conversión del HMF a SMF. El SMF es capaz de reaccionar con el ADN y otras macromoléculas y dar lugar a efectos tóxicos y mutagénicos. Aunque el SMF es muy inestable, se ha detectado recientemente en la sangre de los ratones tratados con HMF, lo que indica su metabolización *in vivo* a SMF. Además, las SULT se manifiestan más extensamente en los tejidos extrahepáticos de los humanos que en el de los roedores siendo su actividad mayor. Esto sugiere que los riesgos asociados a la exposición del HMF podrían ser aún mayores para los humanos que los descritos para los roedores (Monien y col., 2009), aumentando las incertidumbres sobre si la exposición a HMF podría suponer un riesgo real para la salud (Gökmen y Morales, 2012).

1.2. Mecanismos de formación

El HMF es un compuesto intermedio en la RM que se produce cuando las hexosas reductoras se calientan en presencia de aminoácidos o proteínas. Una ruta alternativa consiste en la deshidratación térmica directa de fructosa, sacarosa, y en menor medida, de glucosa. Esta reacción no requiere la presencia de grupos amino y está catalizada en condiciones ácidas. En la Figura 6 se representan las principales rutas de formación del HMF en los alimentos.

1.2.1. Reacción de Maillard

El HMF se forma por degradación del producto de Amadori a través de una enolización-1,2, siendo la 3-deoxiosona el intermedio clave en la reacción. El compuesto de Amadori es capaz de generar, en las mismas condiciones de reacción, aproximadamente 10 veces más HMF que el respectivo azúcar y aminoácido. Si el medio de reacción y las condiciones térmicas son apropiados, el compuesto de Amadori se degradará hacia los PRM. A pH neutro o ligeramente ácido, el producto de Amadori forma el 1,2-eneaminol, el cual pierde un grupo hidroxilo en el C-3 y sufre una desaminación en el C-1 y una hidratación para formar un compuesto intermedio denominado 3-deoxiosona. La 3-deoxiosona sufre ciclicación y genera un hemiacetal el cual se deshidrata para formar finalmente HMF. Esta ruta se la conoce como enolización 1,2.

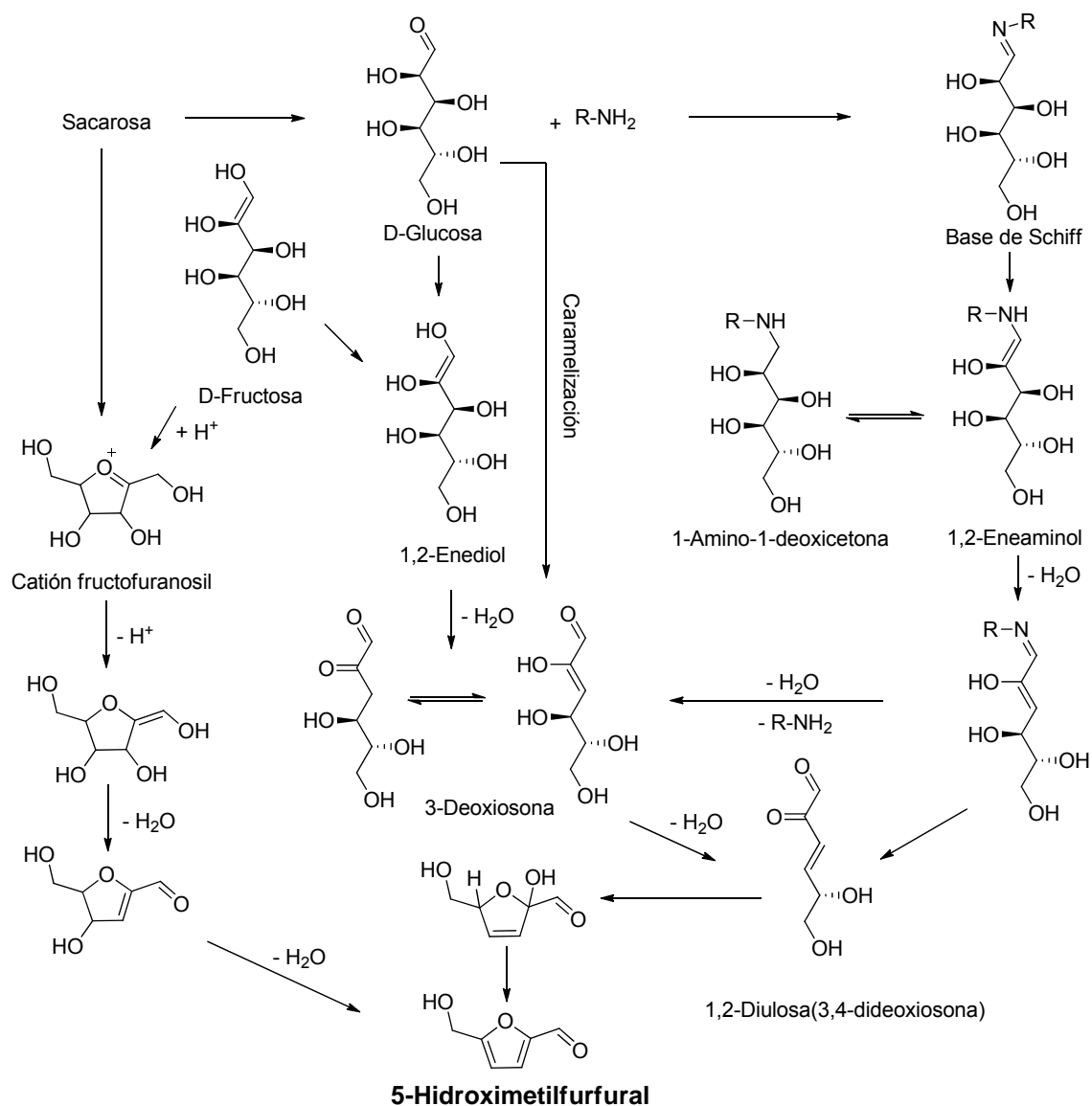


Figura 6. Principales rutas de formación del 5-hidroximetilfurfural (Perez-Locas y Yaylayan, 2008a).

1.2.2. Caramelización

La caramelización requiere mayor energía de activación y temperaturas más elevadas que la RM aunque, de manera similar, también se forma el intermediario 3-desoxiosona. La Figura 6 muestra la formación de HMF por deshidratación de los azúcares durante el calentamiento. Durante la caramelización, los azúcares reductores a través de la enolización-1,2 sufren reacciones de deshidratación y ciclación para formar finalmente el HMF. En condiciones de baja humedad, se ha propuesto una vía alternativa de formación de HMF a partir de la degradación de sacarosa en fructosa, que conlleva la formación del catión reactivo fructofuranosil, el cual puede convertirse directamente a HMF (Perez-Locas y Yaylayan, 2008a). Los autores concluyeron que a temperaturas elevadas, la cantidad de HMF formado a partir de

sacarosa es mayor que a partir de fructosa o glucosa. Esto es debido a que este catión intermedio se convierte de manera más eficiente a temperaturas más bajas en HMF en comparación con la 3-deoxiglucosona, vía glucosa y fructosa.

1.3. Métodos analíticos

Uno de los aspectos más estudiados ha sido el tratamiento de la muestra, y en concreto la extracción del HMF de la matriz del alimento. En el caso de matrices sencillas, como miel, bebidas alcohólicas y zumos de frutas, se realiza una extracción acuosa seguida de una filtración. Sin embargo, para el café se recomienda el uso de técnicas más selectivas como la extracción en fase sólida (SPE) para obtener extractos libres de interferentes (Murkovic y Pichler, 2006).

En los alimentos de base láctea, el extracto, después de la adición de ácido oxálico, se calienta durante 25 min para realizar el cálculo del denominado HMF total. En otros casos, se ha conseguido mejorar la extracción con el empleo de disolventes como metanol o acetato de etilo, seguido de evaporación y reconstitución del extracto en un medio acuoso antes de su análisis.

En los productos a base de cereales y vegetales se recomienda la utilización de soluciones clarificantes como Carrez, $K_4[Fe(CN)_6] + ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, en lugar de ácidos como tricloroacético, metafosfórico o sulfosalicílico, debido a que es posible que a pH bajo se genere HMF *in situ* a partir de la glucosa presente en la matriz. Sin embargo, Ait-Ameur y col. demostraron que el uso del ácido tricloroacético durante la extracción de cereales no condujo de nuevo a la formación de HMF (Ait-Ameur y col., 2006).

Con respecto a la purificación de la muestra, la SPE es el método más utilizado. Lee y col. (Lee y col., 1986) emplearon cartuchos de extracción de octadecil sílice (C_{18}) seguido de un lavado con hexano en extractos de naranja. Gökmen y col. utilizaron también cartuchos de extracción Oasis HLB para clarificar el extracto acuoso antes del análisis por LC-MS (Gökmen y col., 2006a).

En la literatura se ha descrito una amplia variedad de técnicas analíticas para detectar HMF en los alimentos, que incluyen la colorimetría, espectrofotometría y cromatografía (Tabla 5).

Método	Referencia
Colorimétrico	
Resorcinol/HCl	Hadorn y col., 1960
Difenilamina	Garoglio, 1961
Anilina	Dinsmore y Nagy, 1972
Ácido tiobarbitúrico	Keeney y Bassette, 1959
p-Toluidina/ácido tiobarbitúrico	
- Directo	Winkler, 1955
- Automatizado	De la Iglesia y col., 1997
Espectrofotométrico	
Medida directa	
- Atomatizada	Dattatreya y Rankin, 2006
- Derivado	Espinosa-Mansilla y col., 1993
Medida indirecta	
- Tiosemicarbacida	Montilla-Gómez y col., 1988
Polarografía	Reyes-Salas y col., 2006
Espectroscopia	
¹ H RMN	Consonni y Gatti, 2004
Cromatografía	
En papel	
- 2,4-DNPH derivado	Rice y col., 1951
Partición líquido-líquido	Van Duin, 1957
Capa fina	Schuck y Pavlina, 1994
de gases	Teixidó y col., 2006
de líquidos	
- 2,4-DNPH derivado	Lo Coco y col., 1996
- Intercambio aniónico	Kim y Richardson, 1992
- Intercambio catiónico	Risner y col., 2006
- Fase inversa	
Cereales	Rufián-Henares y col., 2006a
Miel	Jeurings y Kupperts, 1980
Mermelada	Rada-Mendoza y col., 2002
Fruta seca	Murkovic y Pichler, 2006
Vinagre	Theobald y col., 1998
Zumo de frutas	Blanco-Gomis y col., 1991
Productos a base de tomate	Porretta y col., 1991
Café	Wu y col., 2009
Leche	Morales y col., 1992
Electroforesis capilar	
Cromatografía electrocinética micelar	Morales y Jiménez-Pérez, 2001

Tabla 5. Métodos para el análisis del HMF en alimentos (Morales, 2009).

En la actualidad, la cromatografía líquida de fase inversa es la técnica más utilizada para analizar de forma precisa y fiable la presencia de compuestos furánicos en alimentos como los zumos de manzana y concentrados, brandys y otras bebidas alcohólicas, café, leche, fórmulas infantiles, cereales de desayuno, productos a base de tomate, y mermeladas. Esta técnica puede determinar directamente HMF, furfural y furfural alcohol sin necesidad de la formación de un derivado coloreado debido a la fuerte absorción en el UV (280 nm aproximadamente) de los furfurales.

La elución del HMF normalmente se lleva a cabo empleando una separación isocrática con fases móviles conteniendo 5-10% de acetonitrilo o metanol en agua, agua acidificada o tampón acetato (ácido acético-acetato sódico, pH 3,6).

Algunos autores utilizaron un derivado de la 2,4-DNPH para el análisis del HMF con el fin de mejorar tanto la selectividad como la sensibilidad del método en matrices como zumo de frutas y cerveza, debido a la alta especificidad que presenta la reacción entre la DNPH y los compuestos carbonílicos. Yuan y col. (Yuan y col., 1998) aplicaron la cromatografía líquida de intercambio iónico con detector fotodiodo array para la separación del HMF, 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona (DMHF), ácido furoico, furfural, 2-acetilfurano y furfural alcohol en zumos de frutas. Posteriormente, Gökmen y col. han utilizado LC-MS con ionización química a presión atmosférica (APCI) en alimentos infantiles (Gökmen y col., 2006a). Finalmente, cabe comentar que, aunque en menor medida, también se han empleado técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (Teixidó y col., 2006) para la determinación de HMF en alimentos.

1.4. Niveles en alimentos

Aunque el HMF no se encuentra presente en productos frescos o no procesados térmicamente, se acumula rápidamente durante el calentamiento y el almacenamiento de alimentos ricos en hidratos de carbono, y en algunos casos puede exceder el valor de 1 g/kg, como ocurre en frutos secos y productos a base de caramelo. El HMF está ampliamente reconocido como un índice válido para estimar el deterioro generado en el alimento como resultado de un calentamiento excesivo o durante condiciones inadecuadas de almacenamiento. De la misma manera, se ha utilizado como marcador para controlar el procesado térmico de algunos productos elaborados a base de cereales como pasta, galletas, pan, cereales de desayuno y pan tostado.

En la Tabla 6 se recogen las concentraciones de HMF encontradas en diferentes alimentos.

Matriz	HMF (mg/kg) * mg/L
Café	100-1900
Café instantáneo	400-4100
Descafeinado	430-494
Achicoria	200-22500
Malta	100-6300
Cebada	100-1200
Miel	10,4-58,8
Cerveza	3,0-9,2 *
Mermelada	5,5-37,7
Zumo de frutas	2,0-22,0
Vino tinto	1,0-1,3 *
Vinagre de malta	1,6-7,3 *
Vinagre de jerez	13,8-34,8 *
Vinagre balsámico	316,4-35251,3 *
Galletas	0,5-74,5
Pan (blanco)	3,4-68,8
Pan (tostado)	11,8-87,7
Pan (<i>snacks</i>)	2,2-10,0
Cereales de desayuno	6,9-240,5
<i>Whisky</i>	1,4-13,1 *
Brandy	1,5-4,8 *
Ron	1,7 *
Alimentos infantiles a base de leche	0,18-0,25
Alimentos infantiles a base de cereales	0-57,18
Fruta desecada	25-2900
Almendra tostada	9
Avellana tostada	2,2-66,5
Productos a base de caramelo	110-9500

Tabla 6. Contenido de HMF en diversos alimentos y bebidas (Capuano y Fogliano, 2011).

1.5. Estimación de ingesta

Como se ha descrito anteriormente, los niveles de HMF encontrados en fruta desecada, caramelo y vinagre balsámico son extremadamente elevados. Sin embargo, los alimentos que más contribuyen a la ingesta de HMF en la población son el café y el pan. Se ha estimado una ingesta aproximada de entre 30 y 150 mg de HMF por día (2,5 mg/peso corporal/día) (Ulbricht y col., 1984). Más recientemente, Rufián Henares y de la Cueva estimaron una ingesta diaria para la población española de 2,1 mg, 9,7 mg y 23,0 mg, valor mínimo, medio y máximo, respectivamente, de HMF en los alimentos (Rufián-Henares y de la Cueva, 2008). Estos resultados están de acuerdo con los publicados en el año 2007 por Delgado-Andrade y col. (Delgado-Andrade y col., 2007b), quienes calcularon una ingesta diaria de 5,1 mg para los adolescentes españoles, pero por debajo de aquellos expuestos por otros autores (Ulbricht y col., 1984). La diferencia podría explicarse a que en la investigación realizada en 1984 por Ulbricht se emplearon métodos espectrofotométricos poco precisos habiéndose producido una sobreestimación en el contenido de HMF. En cualquier caso, la exposición estimada es varios órdenes de magnitud más alta que para otros contaminantes de procesado tales como la acrilamida o el furano. Aún así, los datos que existen en la bibliografía sobre la exposición a HMF son muy limitados, de ahí la necesidad de llevar a cabo estudios adicionales para evaluar tanto el contenido medio como el máximo en las diferentes poblaciones. Además, se ha de tener en cuenta que el almacenamiento y las condiciones de cocinado de los propios alimentos podrían afectar a la exposición real de HMF como ocurre con otras sustancias tóxicas (Gökmen y Morales, 2012).

1.6. Estrategias de mitigación

El HMF se forma por el tratamiento térmico y se encuentra en alimentos procesados, de ahí la necesidad de desarrollar estrategias para reducir su formación durante el cocinado. Hasta la fecha se dispone de abundante información sobre la cinética de las reacciones implicadas y las energías de activación en sistemas modelo que simulan procesos en diferentes matrices alimentarias. Sin embargo, es importante tener en cuenta el balance riesgo/beneficio y la calidad global del producto final. Resultaría útil establecer una base de datos para conocer qué familia de alimentos contribuyen más a la ingesta diaria de HMF, y considerar a partir de ahí métodos prácticos para reducir el contenido en aquellos productos prioritarios. Teniendo en cuenta los posibles mecanismos de formación, previamente comentados, los factores que afectan a la formación de HMF se indican en la siguiente tabla (Gökmen y Morales, 2012).

Factores	Correlación
Precusores (azúcares, aminoácidos)	Positiva
Temperatura	Positiva
Tiempo	Positiva
pH	Negativa
Humedad	Negativa

Tabla 7. Factores que afectan a la formación de HMF en los alimentos.

A continuación se describen algunas estrategias de mitigación, teniendo en cuenta que en la actualidad no es posible una eliminación completa sin afectar a las propiedades organolépticas y a la seguridad de los propios alimentos.

1.6.1. Selección de materia prima

Los azúcares (hexosas) y los aminoácidos son los principales precursores de la formación de HMF. Los alimentos ricos en hidratos de carbono son, por tanto, los productos donde se encontrarán los mayores niveles de HMF. Limitando el contenido de azúcares reductores se reducirá a su vez su formación. Sin embargo, cuando se sustituye, por ejemplo, en las galletas la glucosa o fructosa por sacarosa, se produce paradójicamente un aumento en los niveles de HMF a temperaturas superiores a 250 °C. Además, utilizando bicarbonato amónico como gasificante, la sacarosa se descompone muy rápidamente y por consiguiente produce mayores niveles de HMF (Gökmen y col., 2007).

El uso de ingredientes con un elevado contenido de HMF como jarabe de azúcar o miel, incrementarían las concentraciones en el producto final. Sin embargo, estos ingredientes reforzarían la aceptabilidad del consumidor, de ahí la necesidad de alcanzar un equilibrio riesgo/beneficio. En ciertos casos es posible variar algunos componentes antes del tratamiento térmico, como por ejemplo la composición de la masa durante el procesado de los cereales y de las fórmulas infantiles. Generalmente, si se aumenta el pH de la masa en productos de panadería, los niveles de HMF disminuyen (Gökmen y col., 2007).

1.6.2. Selección de variables de procesado

La RM y la carmelización se ven favorecidas en gran medida por la relación temperatura/tiempo y las condiciones del medio de reacción (contenido de agua, acidez, cationes divalentes). De esta manera, disminuyendo la temperatura durante el procesamiento

y/o almacenamiento se consigue disminuir la formación de HMF de una manera sencilla. En general, el aumento del tiempo de almacenamiento también aumenta la cantidad de HMF formado. Condiciones de baja y moderada humedad se asocian a un aumento en la formación de HMF, debido a que la RM se ve acelerada por la deshidratación del azúcar.

1.6.3. Eliminación tras el procesado

En condiciones extremas de procesado se ha observado un descenso del HMF en galletas debido a la degradación de éste a productos secundarios, la mayor parte volátiles (Ameur y col., 2006). Sin embargo, estas condiciones afectarán de forma drástica a la calidad del producto pudiendo llegar a generarse otros compuestos indeseados como la acrilamida.

2. Acrilamida

La acrilamida (2-propenamida; CAS No. 79-06-1) es una molécula que contiene un doble enlace electrófilo y un grupo amida. Se trata de una sustancia blanca e inodora, que a temperaturas superiores a 84,5 °C sufre polimerización espontánea (Friedman, 2003). Al ser una amida α,β -insaturada le permite reaccionar con compuestos nucleofílicos a través de adiciones de Michael. Debido a la limitada conjugación que envuelve al doble enlace, carece de un fuerte grupo cromóforo para la detección UV-VIS y tampoco presenta fluorescencia. En la Tabla 8 se presenta la estructura y propiedades de la acrilamida.

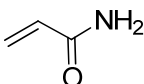
Estructura  C_3H_5NO	Peso molecular	71,08 g/mol
	Punto de fusión	84,5 °C
	Punto de ebullición	136 °C a 25 mm Hg
	Solubilidad	agua, metanol, etanol

Tabla 8. Estructura y propiedades de la acrilamida.

2.1. Historia

La acrilamida se ha utilizado en la industria desde 1950. Puede polimerizarse fácilmente y formar poliacrilamidas cuyas principales aplicaciones destacan en la industria del papel, en el tratamiento de aguas residuales, como acondicionadores del suelo, y como agentes cementantes en la construcción de cimientos de presas, túneles y colectores. Este último uso fue el que llevó a su descubrimiento en los alimentos. Durante la construcción de un túnel ferroviario bajo un lago en el año 1997 en Suecia, se utilizó como agente sellante una gran cantidad de precursores del polímero de acrilamida, filtrándose por accidente parte al agua, contaminando arroyos cercanos y aguas subterráneas. Los primeros efectos fueron la presencia de animales (ganado y peces) con parálisis, además de síntomas neurotóxicos en los trabajadores de dicho túnel (Reynolds, 2002).

En la posterior investigación del accidente se descubrió un aumento significativo en los niveles de los aductos de acrilamida-hemoglobina en los trabajadores (Hagmar y col., 2001), así como en el ganado y en los peces del entorno. Tras nuevas investigaciones, se descubrieron

cantidades inesperadas de aductos en personas que vivían fuera de la zona contaminada (Tareke y col., 2002). El hallazgo en animales y ganados expuestos a la fuga de concentraciones de aductos inferiores a las de las personas no relacionadas con el accidente, hizo que se considerara la posibilidad de que la exposición en los humanos proviniera de otra fuente: los alimentos cocinados. Para ello, se llevaron a cabo una serie de investigaciones en animales de experimentación alimentados durante semanas con alimentos fritos, lo que permitió observar que aquéllos que consumieron una dieta rica en fritos presentaban mayores niveles de los aductos hemoglobina-acrilamida (Tareke y col., 2000). No fue hasta abril de 2002, cuando la Administración Nacional de Alimentos de Suecia anunció concentraciones de acrilamida en una amplia variedad de alimentos fritos y horneados (SNFA, 2002). Este anuncio fue seguido rápidamente por otras publicaciones, informando de concentraciones hasta del orden de partes por millón en alimentos ricos en hidratos de carbono tratados a altas temperaturas (U.S. FDA, 2002). Estos resultados fueron confirmados por otros investigadores, de modo que comenzaron los esfuerzos internacionales para comprender y, finalmente, reducir, el riesgo de la presencia de acrilamida en los alimentos.

2.2. Toxicología

El descubrimiento de la acrilamida en los alimentos provocó un debate público debido a la relativa falta de datos toxicológicos en humanos y al conocimiento de la genotoxicidad de la acrilamida en células y animales de experimentación.

2.2.1. Absorción, distribución, metabolismo y excreción

- Absorción y distribución

A partir de estudios toxicocinéticos llevados a cabo con acrilamida marcada isotópicamente (^{13}C y ^{14}C) se ha demostrado que su absorción puede ocurrir a través de diferentes rutas como la exposición oral, dérmica o por inhalación. Debido a su polaridad, solubilidad en agua y a su bajo peso molecular, la acrilamida se absorbe muy fácilmente (Shipp y col., 2006). Una vez absorbida, la acrilamida se distribuye rápidamente a través de la sangre a los diferentes tejidos y órganos, como el muscular, la piel, el hígado, los riñones, el corazón, el cerebro o el pulmón y se ha detectado también en la placenta y en la leche materna (Schettgen y col., 2004).

- Metabolismo

Posteriormente, la acrilamida se convierte rápidamente en su epóxido genotóxico: glicidamida. Esta epoxidación tiene lugar en el hígado por la acción del citocromo P450 2E1 monooxigenasa

(CYP2E1) mediante la oxigenación del doble enlace de la acrilamida (Friedman, 2003). Posteriormente, la glicidamida y la acrilamida pueden formar conjugados con el glutatión (GSH) a través de la enzima glutatión-S-transferasa (GST) (Paulsson y col., 2005). Una visión general de las principales rutas metabólicas de acrilamida se describe en la Figura 7.

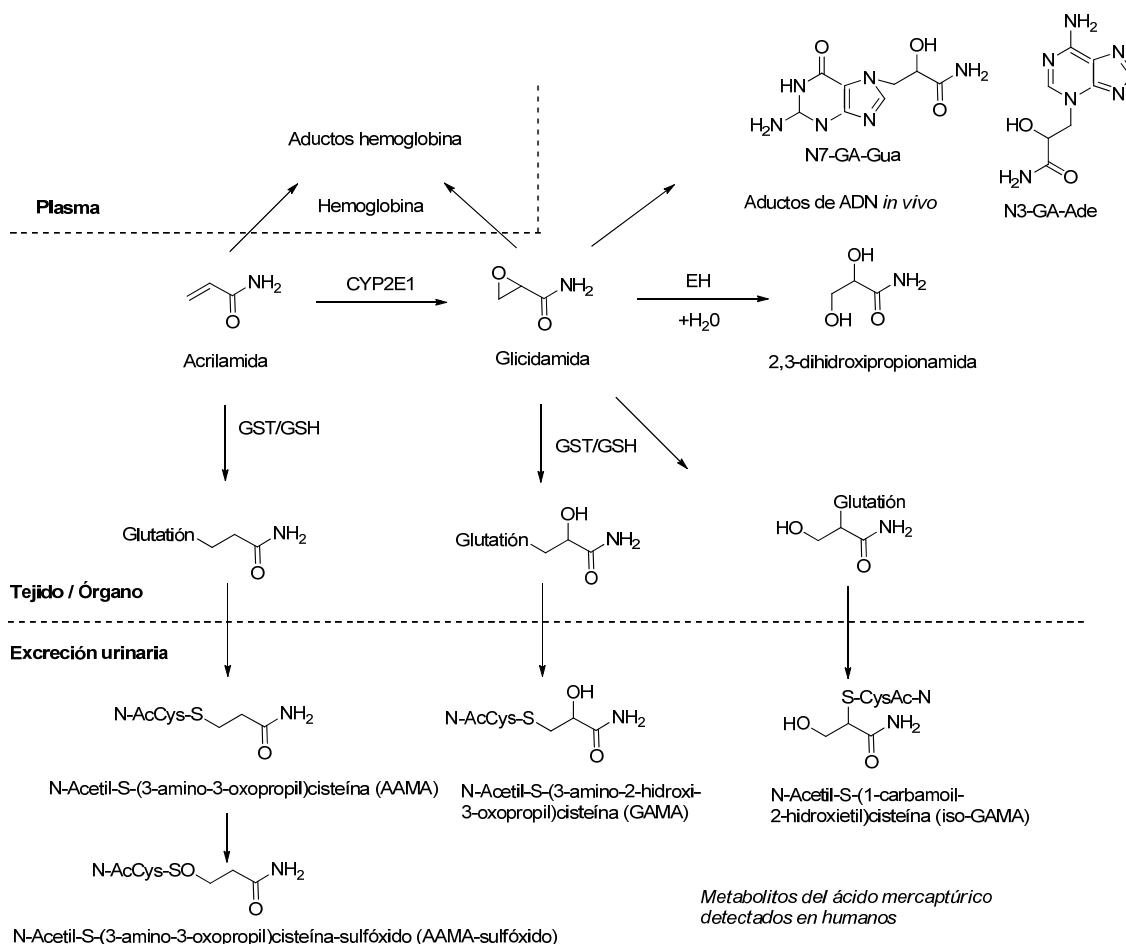


Figura 7. Metabolismo de la acrilamida (basado en Sumner y col., 2003).

La glicidamida también puede ser hidrolizada a través de la hidrolasa epóxido (EH) a 2,3-dihidroxi-3-propionamida o gliceramida (Sumner y col., 2003). Los conjugados de la acrilamida y la glicidamida con el glutatión se convierten en conjugados del ácido mercaptúrico (AAMA, AAMA-sulfóxido, GAMA, iso-GAMA) los cuales son excretados posteriormente a través de la orina. La participación del CYP2E1 en la conversión de la acrilamida a glicidamida se ha demostrado en humanos, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* (Doroshenko y col., 2009). Ambas son sustancias electrófilas con una fuerte afinidad por sitios nucleofílicos. En este sentido, se ha comprobado la formación de aductos tanto con el grupo α -amino del residuo N-terminal de la valina como con el grupo tiol de la cisteína de la hemoglobina (Törnqvist y col.,

2008), siendo la glicidamida más reactiva hacia las proteínas y el ADN que la propia acrilamida. Sin embargo, la epoxidación de la acrilamida a glicidamida parece ser menos importante en los humanos que en los roedores (Fennell y col, 2006).

- Excreción

La eliminación se produce principalmente en la orina como conjugados del ácido mercaptúrico (Figura 7). La mayor parte (40-70%) de la acrilamida marcada, que es absorbida en ratas, se excreta en la orina como metabolitos (Shipp y col., 2006). La excreción de acrilamida en forma de metabolitos urinarios comienza poco después de la exposición y cerca del 50% es excretado en 24 horas (Fennell y col, 2006). A diferencia de los aductos de hemoglobina, los metabolitos urinarios del ácido mercaptúrico pueden dar idea de una exposición a corto plazo (que va desde horas hasta unos días). Además hay que tener en cuenta que estos metabolitos están muy influenciados por factores como el estilo de vida y la edad, ya que se ha demostrado que los niños y adolescentes excretan concentraciones significativamente mayores del metabolito glicidamida (Hartmann y col., 2008).

2.2.2. Toxicidad

- Neurotoxicidad

Los estudios sobre neurotoxicidad en humanos se refieren a la exposición ocupacional de trabajadores a través de la absorción por vía cutánea o por inhalación. Afecta tanto al sistema nervioso central y periférico como a las terminaciones nerviosas, produciendo la inhibición de la liberación de neurotransmisores y la degeneración del nervio terminal (LoPachin y col., 2008). Recientemente, se ha sintetizado un derivado de la melatonina que ha demostrado tener efecto protector frente a la neurotoxicidad causada por la acrilamida (Ahmed y col., 2010). En estudios realizados con ratas y ratones, el nivel sin efecto observable (NOEL) para el efecto neurotóxico se ha estimado entre 0,2 y 10 mg/kg peso corporal/día, muy por encima de la exposición dietética. Sin embargo, se ha encontrado que la neurotoxicidad de la acrilamida podría ser acumulativa, por lo que la exposición dietética podría no ser insignificante (LoPachin, 2004).

- Carcinogenicidad

Desde 1994, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado a la acrilamida como sustancia probablemente carcinogénica en humanos. Varios estudios realizados en roedores apoyan dicha evidencia, ya que puede causar tumores en diversos órganos como el pulmón, útero, piel, cerebro, etc. Además puede afectar a la reparación del

ADN y provocar la síntesis no programada del mismo tanto en las células mamarias humanas como en los tejidos de las ratas (Lafferty y col., 2004).

La oxidación de la acrilamida a glicidamida es un requisito previo para estimar su genotoxicidad debido a que esta última presenta mayor reactividad para formar aductos con el ADN (Rice, 2005; Tareke y col., 2006). Aunque la acrilamida y la glicidamida reaccionan directamente con la hemoglobina, sólo la glicidamida lo hace extensamente con el ADN, formando el aducto N7-GA-Gua (N7-(2-carbamoil-2-hidroxiethyl)guanina) y en menor proporción el aducto N3-GA-Ade (N3-(2-carbamoil-2-hidroxiethyl)adenina) (Figura 7) (Dybing y col., 2005; Doerge y col., 2005). Por todo ello, la glicidamida ha demostrado ser mutagénica y genotóxica *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, en un estudio realizado en bacterias y líneas celulares de mamíferos se ha demostrado que la acrilamida no es genotóxica *in vitro* ya que no se activó metabólicamente a glicidamida (Koyama y col., 2011). Por otra parte, la extrapolación de estos resultados a los humanos no es tan evidente, entre otras cosas por los elevados niveles de exposición utilizados en los estudios llevados a cabo con animales y células en comparación con la exposición a través de los alimentos, las diferencias en las vías de exposición así como en el metabolismo (Dybing y col., 2005).

Hasta ahora, los estudios epidemiológicos no han respondido de forma clara y sin ningún tipo de ambigüedad a la pregunta de si la exposición dietética a la acrilamida puede aumentar el riesgo de cáncer en los humanos. Algunos resultados coinciden en señalar que no hay asociación entre la ingesta total de acrilamida en la dieta y el riesgo de contraer algunos tipos de cáncer (revisión de Mucci y col., 2009), mientras que para tipos de cáncer como el renal, de esófago, de ovario o de mama, los resultados epidemiológicos son contradictorios (Wilson y col., 2010; Larsson y col., 2009; Hogervorst y col., 2008; Lin y col., 2011). Sin embargo, de forma general los estudios epidemiológicos suelen tener limitaciones, ya sea en la evaluación de la exposición (generalmente con cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos), las co-exposiciones o la capacidad limitada para detectar pequeños aumentos en la incidencia de tumores (Mucci y col., 2006). Por tanto, la asociación real entre la exposición a acrilamida a través de los alimentos y el riesgo de algunos tipos de cáncer podría ser mayor que los riesgos relativos estimados a través de los estudios epidemiológicos.

- Evaluación de riesgos

El Reglamento (CE) Nº 1272/2008 sobre sustancias de riesgo ha clasificado el monómero de acrilamida como carcinógeno de categoría 1B-H350 y mutágeno de categoría 1B-340 en

humanos (Reglamento (CE) Nº 1272/2008). La acrilamida, como carcinógeno genotóxico, se considera que no tiene umbral límite de exposición para su reacción con el ADN y por lo tanto, efectos adversos (O'Brien y col., 2006). En el área de seguridad alimentaria, tales compuestos son tratados principalmente por el principio "ALARA", lo que significa que los niveles deben ser "tan bajos como sean razonablemente posibles". Sin embargo, este enfoque se basa únicamente en la identificación del peligro y no tiene en cuenta ni el potencial cancerígeno ni la exposición humana.

Otra de las técnicas generalmente empleadas para caracterizar el riesgo para los seres humanos es la extrapolación de la relación dosis-respuesta. Los datos obtenidos con animales deben extrapolarse a dosis muy inferiores a las estudiadas para poder compararlos con los niveles de exposición en humanos. En consecuencia, podría estimarse el número de cánceres adicionales causados por exposición debido a la acrilamida (O'Brien y col., 2006). La estimación del potencial carcinógeno varía según los modelos matemáticos utilizados para la extrapolación. Comúnmente, en los métodos de extrapolación lineal a dosis bajas no se tienen en cuenta los procesos biológicos involucrados en la carcinogénesis y la biodisponibilidad, dando lugar probablemente a una sobreestimación del riesgo real (Dybing y col., 2003).

Como se ha comentado, las dosis empleadas de acrilamida en los experimentos con animales están muy por encima de la exposición dietética para los humanos. Por tanto, el grado de conversión de acrilamida a glicidamida, así como mecanismos de reparación de ADN y apoptosis, pueden ser muy diferentes a dosis bajas (FAO/WHO, 2005). En una revisión reciente se ha discutido la evidencia sobre la carcinogenicidad de la ingesta dietética de acrilamida a partir de estudios epidemiológicos y en ensayos realizados con roedores (Hogervorst y col., 2010). Los resultados demuestran que algunos tipos de cáncer se encontraron tanto en ratas como en humanos mientras que otros exclusivamente en humanos, indicando que la genotoxicidad no puede ser el único mecanismo por el que la acrilamida causa cáncer, sino que ésta podría influir en el sistema hormonal, en el cual los roedores no son buenos modelos.

Otro enfoque diferente de evaluación recomendado por la EFSA para la evaluación del riesgo es el Margen de Exposición (MOE) (EFSA, 2005b). El valor del MOE indica el nivel de riesgo y es de utilidad en el establecimiento de prioridades para la implementación de medidas que protejan la salud pública. Se le considera como la aproximación más apropiada para compuestos genotóxicos y cancerígenos como es el caso de la acrilamida. Cuanto menor sea el valor MOE, mayor potencial de riesgo para la salud tendrá la sustancia objeto de estudio.

Teniendo en cuenta que un MOE > 10.000 indicaría una baja preocupación, para el caso de la acrilamida se ha calculado un MOE entre 300 para los consumidores medios (1 µg/kg peso/día) y 75 para los consumidores de riesgo (4 µg/kg peso/día). Es de destacar que el MOE de la acrilamida está muy por debajo del calculado para el caso de otros contaminantes de procesado como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (25.000 para los consumidores medio) y la amina heterocíclica PhIP (260.000 para el consumidor medio). Por tanto, la ingesta diaria de acrilamida puede ser considerada como un riesgo potencial para la salud del consumidor (O'Brien y col., 2006).

- Exposición

A través de fuentes diferentes a la dieta

Desde mediados de 1950, se produce acrilamida a partir de acrilonitrilo en las plantas industriales. Básicamente, la acrilamida es polimerizada para formar poliacrilamida cuyo principal uso es el tratamiento de aguas residuales y de consumo, con la finalidad de eliminar partículas sólidas y otras impurezas. El propio polímero no es tóxico, pero puede existir algún residuo del monómero que justifica su estricto control. La acrilamida también se utiliza en materiales de construcción y en la fabricación de pegamentos, papel, en agentes acondicionadores del suelo y en el procesado de minerales. También puede utilizarse en la producción de plásticos, textiles y pintura. Los utensilios domésticos, los materiales de construcción así como ciertas partes de los automóviles están revestidos con resinas de acrilamida. Algunos cosméticos contienen también acrilamida monomérica residual debido al hecho que la poliacrilamida se utiliza por ejemplo en los champús como agente espumante, y como lubricante en los maquillajes, jabones y lociones. En la Tabla 9 se recoge la legislación referente a la exposición a acrilamida a través de las diferentes fuentes.

La acrilamida puede ser absorbida a través de la piel, a través de las membranas mucosas así como en el tracto gastrointestinal. La exposición humana a acrilamida es principalmente ocupacional en el caso del contacto dérmico con el monómero sólido, y por inhalación de polvo y vapores. Otra fuente importante de exposición es a través del humo del tabaco, detectándose entre 1 y 2 µg en cada cigarrillo (Friedman, 2003).

Exposición	Límite	Legislación
Migración de envases	10 µg/kg	Directiva 2002/72/CE
Agua de consumo	0,1 µg/L	Directiva 98/83/EC
Cosméticos	100 µg/kg	European Commision, 2002
Aire zona trabajo	30 µg/m ³	EU-OSHA, 2008
Revestimientos (edificios, infraestructuras)	0,1% en peso	Reglamento (UE) Nº 366/2011

Tabla 9. Legislación sobre la exposición a acrilamida.

A través de la dieta

La evaluación de la exposición dietética a contaminantes puede realizarse mediante un método directo o indirecto, y la elección del método depende de los objetivos de la evaluación y de los recursos disponibles.

El primero de estos métodos se basa en la monitorización de la dieta durante 24 horas y conlleva la preparación por duplicado de todos los alimentos que se consumen durante el día. En paralelo se realiza el análisis del compuesto de interés. Este método necesita de un gran esfuerzo por parte de los participantes y no permite la investigación de los alimentos que más contribuyen a la ingesta. Más que para estudios de ingesta media, es especialmente útil cuando se trata de estudiar la ingesta de contaminantes muy concretos en grupos especiales de población. No obstante, puede ser utilizado para correlacionar los valores dietéticos de acrilamida con los biomarcadores a corto plazo, como son los metabolitos en la orina o los aductos de ADN (Konings y col., 2007).

El segundo método es indirecto ya que combina las concentraciones de acrilamida en determinados alimentos con las cantidades de los alimentos que se consumen (ver fórmula) en un periodo de tiempo determinado por una población de interés. Esta combinación de datos permite estimar la exposición con la ayuda de modelos determinísticos, que permiten conocer de manera general la exposición media, o modelos probabilísticos (ejemplo: modelo Monte Carlo), donde la distribución de las concentraciones de acrilamida se combina con la distribución de los datos de consumo (Lineback y Stadler, 2009).

$$\text{Exposición} = \frac{\Sigma (\text{Concentración de acrilamida en el alimento (mg/kg)} \times \text{consumo (kg/día)})}{\text{Peso corporal (kg)}}$$

Los datos de concentración de acrilamida en los alimentos pueden obtenerse a través de bases de datos. En el caso de los Estados Unidos, la recopilada por el Instituto Mixto de Inocuidad de los Alimentos y Nutrición Aplicada (JIFSAN) junto con el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) (JIFSAN/JECFA). Para Europa los valores de acrilamida fueron reunidos por el Instituto de Referencia de Materiales y Medidas (IRMM) en colaboración con la Dirección General de Salud y Consumidores de la Comisión Europea (DG SANCO) y la CIAA (JRC-IRMM, 2006). Desde 2003 hasta junio de 2006 se incorporaron alrededor de 8600 datos procedentes de nueve países miembros de la UE y de industrias alimentarias. A partir de entonces, se ha estado realizando un seguimiento anual de los niveles de acrilamida en los alimentos para los años 2007, 2008 y 2009, de conformidad con un plan de muestreo organizado por la EFSA para los Estados miembros. El 20 de abril de 2011 se publicó el informe científico de la EFSA, en el cual estaban recogidos los 10.366 resultados de acrilamida en diferentes alimentos enviados por 23 Estados miembros y Noruega durante ese periodo (EFSA, 2011). De la misma manera, el proyecto HEATOX (*Heat-Generated Food Toxicants, Identification, Characterisation and Risk Minimisation*), del cual se hablará posteriormente, estudió la evaluación de la exposición y la toxicología para llegar a una caracterización de los riesgos de la ingesta de acrilamida (HEATOX, 2007). Por otra parte, los datos sobre composición de la dieta pueden ser recogidos a través de encuestas de consumo de alimentos realizadas a un consumidor individual o a nivel de hogares. Se pueden estimar también a través de las estadísticas de compra de los alimentos.

Sin embargo, estos métodos descritos presentan también desventajas; las estadísticas de compra de alimentos sólo proporcionan datos sobre las cantidades de alimentos que se compran, y no tienen en cuenta la ingesta real. Las encuestas de consumo consisten en cuestionarios de frecuencia de alimentos (FFQ), donde a los consumidores se les puede pedir que lleven un registro del consumo (*food record method*) o ser entrevistados y recordar dicho consumo (*food recall method*). El método de entrevistas puede ser erróneo al no recordar los consumidores lo que comen con precisión, del mismo modo, no siempre se quiere decir exactamente qué cantidad se ingirió de un determinado alimento con connotaciones negativas.

Los métodos mencionados anteriormente se han aplicado en diversos países de todo el mundo. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se basan en el método indirecto.

El JECFA estimó una ingesta diaria de acrilamida comprendida entre 0,3 y 2,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal para la población general y hasta 5,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal para los grandes consumidores (percentil 99). Los alimentos que más contribuyen a la exposición total fueron las patatas fritas (*french fries*) (16-30%), las patatas fritas de aperitivo (*crisps*) (6-46%), el café (13-39%), las galletas (10-20%), el pan y los productos de bollería (10-30%). El resto de los alimentos contribuyen menos del 10%. Los valores de ingesta de 1 y 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal (asumiendo un peso corporal de 60 kg) fueron seleccionados por el JECFA para representar a la población en general y a los grandes consumidores (incluidos los niños), respectivamente (FAO, WHO, 2005).

El informe de la EFSA del 2011 incluye una evaluación de la estimación de exposición a la acrilamida en Europa para diferentes grupos de edad. La ingesta media (límite superior) para las personas mayores de 18 años se estima que oscila entre 0,31 y 1,07 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal/día y para el percentil 95 entre 0,58 y 2,26 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día (Tabla 10). Las patatas fritas, el pan y el café tostado fueron identificados como las principales fuentes de exposición (Tabla 11).

En España, los alimentos que más contribuyeron (Figura 8) fueron las patatas fritas, el pan, las galletas y las patatas fritas de aperitivo, cuya ingesta se estudiará en el **Capítulo 4** de la Parte Experimental.

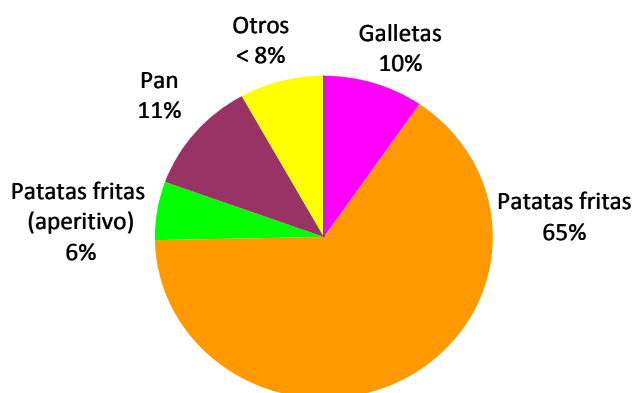


Figura 8. Contribución (%) de cada grupo de alimentos fijados por la EFSA a la exposición total de acrilamida en la población española (adultos 18-64 años) (EFSA, 2011).

Por otro lado, existen también métodos alternativos de estimación de ingesta, los cuales se basan generalmente en los niveles internos de biomarcadores de exposición, incluidos los niveles de aductos de hemoglobina o los metabolitos en la orina. Sin embargo, no se ha encontrado en todos los casos una clara correlación entre éstos y la ingesta de acrilamida.

País	Edad	Exposición media µg/kg peso/día	Exposición (P95) µg/kg peso/día	Método
Bélgica	Adultos	0,36-0,39	0,95-0,99	Encuesta recordatorio 24 h de consumo de alimentos ¹
	Mayores	0,28-0,31	0,76-0,82	
	Ancianos	0,32-0,35	0,84-0,87	
República Checa	Adultos	0,73-0,77	1,59-1,65	Registro de consumo de alimentos ²
Alemania	Adultos	0,31-0,34	0,79-0,83	Encuesta recordatorio 24 h
	Mayores	0,29-0,32	0,72-0,76	
	Ancianos	0,31-0,34	0,81-0,84	
Dinamarca	Adultos	0,76-0,80	1,50-1,56	Registro de consumo
	Mayores	0,91-0,95	1,74-1,84	
	Ancianos	1,02-1,07	2,19-2,26	
España	Adultos	0,42-0,45	1,09-1,13	Registro de consumo
	Adultos	0,55-0,57	1,18-1,23	Encuesta recordatorio 24 h
Finlandia	Adultos	0,49-0,52	1,04-1,09	Encuesta recordatorio 24 h
	Mayores	0,49-0,52	1,06-1,14	
Francia	Adultos	0,39-0,42	0,87-0,92	Registro de consumo
	Mayores	0,28-0,31	0,57-0,62	
	Ancianos	0,26-0,29	0,55-0,58	
Reino Unido	Adultos	0,61-0,65	1,19-1,24	Registro de consumo
Hungría	Adultos	0,75-0,79	1,52-1,58	Registro de consumo
	Mayores	0,69-0,73	1,26-1,31	
	Ancianos	0,79-0,83	1,53-1,58	
Irlanda	Adultos	0,54-0,58	1,22-1,26	Registro de consumo
Italia	Adultos	0,54-0,57	1,16-1,20	Registro de consumo
	Mayores	0,50-0,53	1,12-1,17	
	Ancianos	0,50-0,54	1,10-1,15	
Letonia	Adultos	0,42-0,45	1,09-1,15	Encuesta recordatorio 24 h
Holanda	Adultos	0,50-0,53	1,25-1,30	Registro de consumo
Suecia	Adultos	0,47-0,51	0,93-0,98	Registro de consumo

Tabla 10. Exposición media a acrilamida y percentil 95 (límite inferior y superior) en diferentes grupos de edad en cada Estado miembro. Adulto (18-64 años), mayores (65-74 años) y ancianos (≥ 75 años) (EFSA, 2011). ¹ 24 h dietary recall, ² dietary record.

País	Edad	Galletas	Patatas fritas	Patatas fritas de aperitivo	Patatas asadas	Pan tostado	Pan de molde	Cereales desayuno	Sustitutos del café	Café tostado	Café instantáneo	Muesli
Bélgica	Adultos	11,2	31,1	9,4	0,2	1,4	20,7	2,6	0,8	13,6	1,7	1,6
	Mayores	11,0	26,6	2,4	0,2	1,7	26,2	0,6	3,4	21,2	1,1	3,0
	Ancianos	11,8	26,0	1,3	0,1	1,4	23,4	0,5	7,8	17,8	1,7	5,8
Rep. Checa	Adultos	8,0	54,3	5,1	0,0	3,7	13,1	0,5	0,5	3,0	0,9	0,3
Alemania	Adultos	6,1	26,7	5,3	2,0	4,0	21,6	1,2	0,5	19,8	0,2	2,1
	Mayores	5,7	27,5	0,8	0,8	5,3	25,0	1,0	1,1	21,4	0,3	1,8
	Ancianos	5,2	34,8	0,8	0,7	4,7	22,3	1,4	1,6	17,4	0,2	1,3
Dinamarca	Adultos	0,3	59,2	2,9	0,0	0,8	13,5	1,0	0,0	13,3	0,0	0,4
	Mayores	0,2	67,7	0,2	0,0	0,8	11,2	0,5	0,0	13,3	0,0	0,4
	Ancianos	0,4	71,5	0,4	0,0	0,8	9,5	0,3	0,0	9,8	0,0	0,2
España	Adultos	12,1	58,6	4,6	0,0	0,3	14,5	2,8	0,1	1,3	1,1	0,2
	Adultos	9,5	64,6	5,8	0,0	0,0	11,3	1,5	0,1	0,5	2,6	0,2
Finlandia	Adultos	0,0	19,3	2,4	0,0	1,2	0,0	3,9	0,0	13,7	0,0	0,1
	Mayores	0,0	21,6	0,5	0,0	1,0	0,0	6,5	0,0	11,1	0,0	0,0
Francia	Adultos	7,6	12,9	1,6	3,8	5,3	17,5	1,3	0,4	39,9	0,5	1,0
	Mayores	2,9	7,8	0,4	3,4	6,1	29,0	0,7	1,9	41,4	0,8	0,8
	Ancianos	2,5	9,8	0,0	2,9	9,4	30,0	0,2	0,5	38,5	1,1	0,3
Reino Unido	Adultos	6,3	41,3	8,5	17,3	2,0	10,2	5,0	0,0	0,7	0,0	3,6
Hungría	Adultos	2,7	62,3	1,0	0,0	3,3	12,9	0,3	0,3	3,5	0,2	0,1
	Mayores	3,4	63,1	1,1	0,0	2,6	12,9	0,1	0,2	2,8	0,1	0,0
	Ancianos	3,9	64,9	0,0	0,0	3,1	12,3	0,2	0,0	1,7	0,1	0,0
Irlanda	Adultos	10,1	46,1	6,9	3,8	2,4	15,5	5,3	0,0	0,7	2,7	1,6
Italia	Adultos	10,3	40,1	1,0	0,0	5,3	13,3	0,5	0,1	11,9	0,0	0,1
	Mayores	9,5	47,7	0,0	0,0	5,7	15,2	0,2	0,5	10,9	0,0	0,1
	Ancianos	10,9	46,6	0,0	0,0	6,8	17,2	0,2	0,6	9,3	0,0	0,0
Letonia	Adultos	9,8	41,1	5,6	1,5	0,7	20,7	4,9	1,4	6,4	1,5	0,6
Holanda	Adultos	10,4	38,6	13,4	1,8	3,7	18,3	0,3	0,1	8,9	0,5	2,2
Suecia	Adultos	5,0	35,2	5,3	4,1	9,7	11,7	1,5	0,0	14,0	0,0	13,1

Tabla 11. Contribución (%) de cada grupo específico de alimentos a la exposición media total de acrilamida en diferentes grupos de edad en cada Estado miembro. Adulto (18-64 años), mayores (65-74 años) y ancianos (≥ 75 años) (EFSA, 2011).

2.3. Actividades en materia de regulación

Actualmente, y después de más de diez años de investigación para entender los mecanismos de formación de la acrilamida y los efectos toxicológicos, no existe reglamentación alguna que establezca límites máximos en alimentos de manera concluyente. En cambio, diversas organizaciones gubernamentales/autoridades, asociaciones empresariales y grupos de expertos a través de proyectos de investigación, han optado por centrarse en estrategias eficaces de mitigación y actividades de seguimiento de valores de acrilamida para resolver el problema. A continuación se expone lo más destacado en este ámbito.

2.3.1. Actividades de seguimiento de niveles de acrilamida

En Europa, la Recomendación 2007/331/CE de la Comisión (Recomendación 2007/331/CE) y la Recomendación 2010/307/UE (Recomendación 2010/307/UE), establecieron programas de control en determinados productos alimenticios, cuyos datos fueron recopilados y publicados en el informe científico de la EFSA de 2011 (EFSA, 2011). Aunque aún no se han fijado límites máximos, la Comisión Europea sí que ha adoptado una recomendación en la que se sugieren valores indicativos (Tabla 12) y, en el caso de que en las actividades de control, con arreglo a la Recomendación 2010/307/UE, se superen dichos valores, se realicen estudios de investigación más detallados (European Commission, 2011).

Alimentos y bebidas	Valor indicativo (µg/kg)
Patatas fritas	600
Patatas fritas de aperitivo	1000
Pan	150
Cereales de desayuno	400
Galletas, <i>crackers</i> , pan tostado	500
Café	450
Café soluble	900
Alimentos infantiles	90
Galletas infantiles	250
Alimentos basados en cereales procesados (niños)	100

Tabla 12. Valores indicativos de acrilamida (European Commission, 2011).

2.3.2. “Caja de herramientas” de la CIAA

La Confederación de Industrias Alimentarias de la UE (CIAA), en colaboración con la Comisión Europea y las autoridades nacionales de los Estados miembros de la UE, desarrolló en septiembre de 2006 una guía que resume las medidas disponibles para reducir los niveles de acrilamida en determinados alimentos (productos de panadería y galletería, cereales de desayuno, productos fritos a base de patatas /snacks de patata y patatas fritas tradicionales). Desde entonces se ha ido actualizando, siendo la última edición de septiembre de 2011, y se ha llegado a convertir en un manual de referencia para el sector.

A continuación se definen los 14 parámetros de la guía que pueden ser revisados para controlar los niveles de acrilamida, agrupados en cuatro grupos principales.



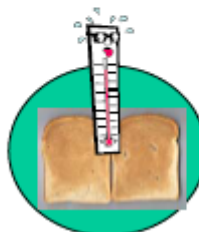
- Agronómicos
 - Azúcares reductores
 - Asparagina



- Formulación
 - Gasificantes
 - Ingredientes minoritarios
 - pH
 - Dilución y relación superficie/volumen
 - Reutilizado
 - Fermentación



- Procesado
 - Condiciones térmicas y humedad
 - Asparaginasa
 - Pretratamiento, ejemplo: escaldado, cationes
 - Color del producto final
 - Textura/sabor



- Condiciones finales
 - Consumidor

Figura 9. Parámetros para controlar los niveles de acrilamida en alimentos (CIAA, 2011).

Con objeto de ayudar a las industrias alimentarias en la aplicación de esta “caja de herramientas”, se ha desarrollado una serie de folletos informativos que proporcionan recomendaciones eficaces para evitar la formación de acrilamida, así como pautas necesarias para ponerlas en práctica. En junio de 2012, *FoodDrinkEurope* (anteriormente CIAA) ha publicado estos folletos revisados en los cuales se ha incluido información sobre el principio "ALARA" con respecto a los niveles de este contaminante en los alimentos, una estructura mejorada y más fácil de usar y nuevas herramientas de mitigación. Estos folletos están disponibles en más de 20 idiomas en la siguiente página web:

http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/acrylamide_en.htm

2.3.3. Proyecto HEATOX

El proyecto HEATOX desarrollado entre el 2003 y el 2007, fue financiado por la Comisión Europea, con el objetivo de investigar los riesgos para la salud que suponen la acrilamida y otros compuestos que se forman con el tratamiento térmico de los alimentos, como son el HMF y los furanos. El informe final incluyó una serie de recomendaciones para minimizar la formación de acrilamida en diferentes alimentos que fueron publicadas en el documento “*Guidelines to authorities and consumer organisations on home cooking and consumption*” (HEATOX, 2007).

2.3.4. Valor señal

En agosto de 2002, se puso en marcha en Alemania una estrategia de monitorización y minimización de los niveles de acrilamida en los alimentos. Para ello, se definió un parámetro denominado valor señal (*signal value*) para cada uno de los grupos de alimentos básicos. Este valor señal identifica el 10% de los productos de cada grupo que tienen los niveles más altos de acrilamida y es revisado y publicado anualmente (BVL, 2002). Las empresas que alcancen ese valor en sus productos, se les piden que revisen el proceso de elaboración y tomen las medidas oportunas. Sin embargo, no se toma ninguna acción legal en el caso de que las empresas no cumplan con las peticiones, aunque los resultados se hacen públicos. En el **Capítulo 4**, Artículo 4.1 se verá aplicado este concepto para el caso de las patatas fritas de aperitivo en España.

2.3.5. Organismos internacionales y otros

- Comisión del Codex Alimentarius

La Comisión del Codex Alimentarius es una organización internacional que fue establecida en 1963 por la FAO y la OMS con el propósito de proteger la salud de los consumidores. En el año

2009 presentó un Código de Prácticas (CAC/RCP 67-2009) con la finalidad de orientar a las autoridades de los países y a los fabricantes, así como a otros organismos pertinentes, para prevenir y reducir la formación de acrilamida en productos a base de patata y de cereales. Para llevar a cabo dicho cometido, es necesario que no se produzca incremento de otros contaminantes, ni cambios negativos en las propiedades organolépticas y que no se comprometa la estabilidad microbiológica del producto final.

- FAO/OMS

En junio de 2002, la OMS organizó una reunión conjunta FAO/OMS, en la cual se recomendó que se estableciera una red informática internacional sobre acrilamida en los alimentos y se invitara a todas las partes interesadas a compartir los datos pertinentes, así como las investigaciones en curso. Como consecuencia de ello, se creó una red informática sobre acrilamida en los alimentos (Acrylamide Infonet, 2002). Posteriormente, a solicitud del Codex Alimentarius, el JECFA llevó a cabo una evaluación de riesgos en febrero de 2005 en Roma, donde se alcanzaron las mismas conclusiones que en la anterior reunión de la OMS.

- FDA

En Estados Unidos, la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA) en el año 2002, publicó su Proyecto de Plan de Acción para hacer frente al tema de la acrilamida en los alimentos, la última versión salió publicada en el año 2004. Actualmente, la FDA continúa estudiando los efectos sobre la salud de la acrilamida en los alimentos y no ha impuesto acción regulatoria alguna. Tampoco ha recomendado dejar de comer productos que contengan acrilamida, sino que por el momento el mejor consejo es simplemente seguir una dieta saludable, escogiendo una variedad de alimentos bajos en grasas *trans* y saturadas, y ricos en fibra, además del consumo de frutas y verduras.

- Propuesta 65 de California

La Propuesta 65 o el Acta de Aplicación de Seguridad en Agua Potable y Tóxicos de 1986, es una ley estatal de los Estados Unidos que solicita que los negocios en California informen a los ciudadanos de las exposiciones significativas a los compuestos que potencialmente pueden causar cáncer o daño reproductivo. Los negocios pueden reformular sus productos hacia exposiciones menores que se encuentren por debajo de los niveles estimados por el Estado, o pueden advertir a los ciudadanos de la exposición por medio de un etiquetado en sus productos o colocando un aviso de advertencia.

Con respecto a la acrilamida, desde 1990 California ya incluía esta sustancia en la lista de los carcinógenos enumerados en la Propuesta 65, es decir, 12 años antes de que se descubriera su presencia en los alimentos. Tras este descubrimiento, se exigió a los negocios alimentarios, incluyendo a fabricantes, tiendas y restaurantes, que colocaran advertencias cuando vendieran productos que contuviese acrilamida. En febrero de 2011, la Oficina de Evaluación de Riesgos de la Salud y el Medio Ambiente (OEHHA) de California ha introducido también en la Propuesta 65 la acrilamida como un compuesto que produce efectos tóxicos en la reproducción (OEHHA, 2011).

- Canadá

El Gobierno de Canadá incluyó la acrilamida en su Plan de Gestión de Productos Químicos. Dicho plan toma medidas inmediatas para regular las sustancias que son perjudiciales para la salud o el medio ambiente. El 21 de febrero de 2009, el Gobierno de Canadá dio a conocer su informe de evaluación. Para garantizar que la exposición a la acrilamida a través de las diferentes fuentes de alimentos sea lo más baja posible, Canadá se ha comprometido a trabajar con las autoridades sanitarias de otros países para comprender mejor cómo se forma, los alimentos que contienen las cantidades más altas, y el impacto que tiene en la salud. Por otro lado, ha preparado una serie de recomendaciones con el fin de minimizar la formación de acrilamida en los alimentos preparados en los hogares. Algunos ejemplos son: no almacenar las patatas por debajo de 8 °C, lavar o remojar las patatas frescas cortadas en agua durante varios minutos antes de freír, y utilizar temperaturas máximas de 175 °C, en el caso de la fritura, o 230 °C en el caso del horneado, siempre dejando las patatas con un color final dorado claro. Además, aconseja limitar los alimentos altos en grasa (como las patatas fritas), el azúcar o la sal y seguir una alimentación saludable (Health Canada).

2.4. Mecanismos de formación

A continuación se discuten las diferentes vías de formación de la acrilamida en los alimentos, junto con los principales precursores y productos intermedios, siendo la RM la ruta principal.

2.4.1. Reacción de Maillard

Como se muestra en la Figura 10, el primer paso de la RM conlleva la condensación de un aminoácido (por ejemplo, asparagina) con el grupo carbonilo de un azúcar reductor para formar un conjugado N-glicosil (por ejemplo, N-glicosilasparagina) que está en equilibrio con su base de Schiff. La N-glicosilasparagina genera grandes cantidades de acrilamida, lo que

sugiere que esta etapa inicial es clave (Stadler y col., 2002). A partir de la base de Schiff, la RM ocurrirá preferentemente a través del producto de Amadori (I) dando lugar a la formación de compuestos coloreados y de sabor, en lugar de acrilamida. Dado que el compuesto de Amadori no se descarboxila fácilmente, es decir no es un intermedio favorable, se puede concluir que la formación de acrilamida sigue otros caminos en la RM (Yaylayan y col., 2003; Stadler y col., 2004).

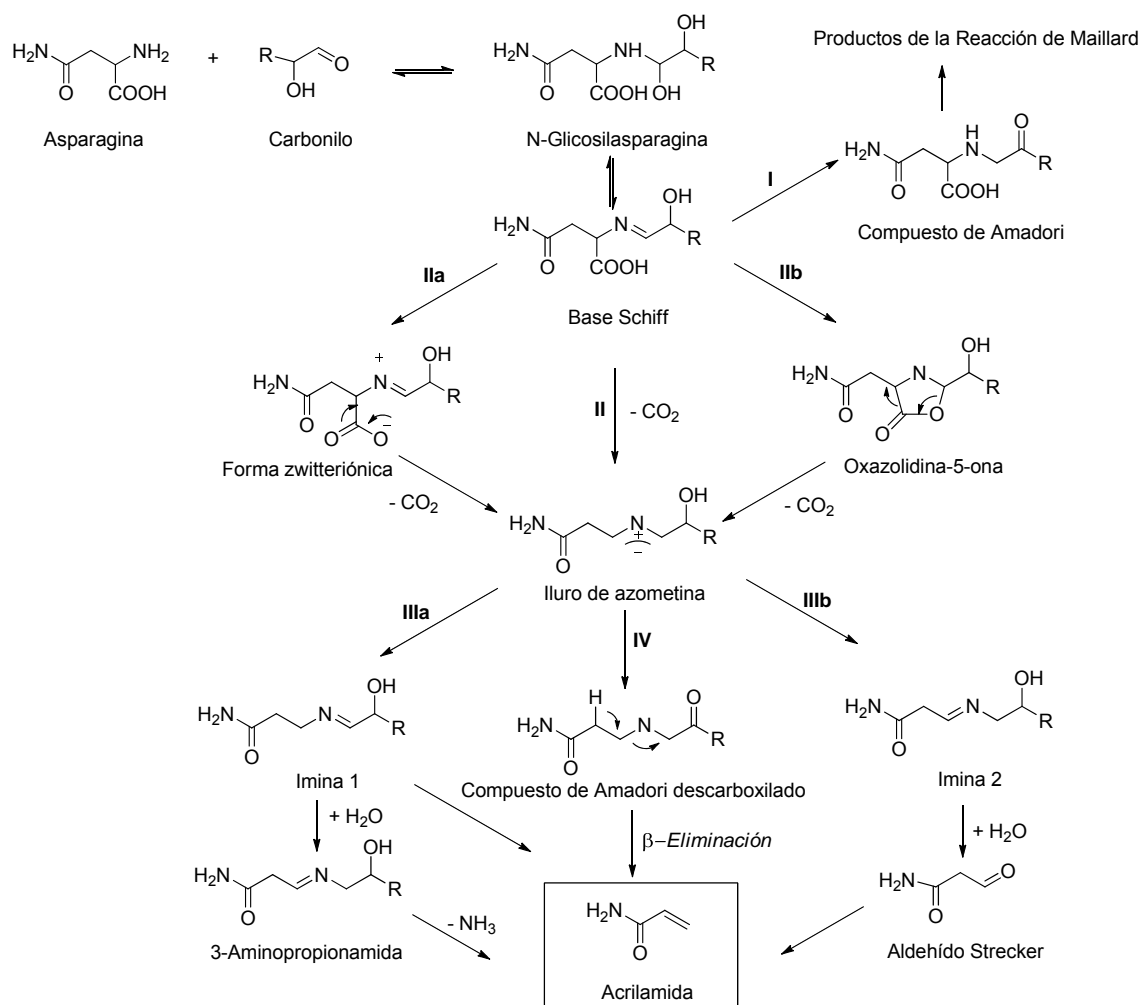


Figura 10. Mecanismo de formación de acrilamida a partir de asparagina y un grupo carbonilo a través de la RM (Yaylayan y col., 2003; Zyzak y col., 2003; Stadler y col., 2004; Yaylayan y Stadler, 2005).

La descomposición térmica de la asparagina en ausencia de una fuente de grupos carbonilo puede generar acrilamida por descarboxilación y desaminación, aunque la presencia de azúcares reductores aumenta considerablemente las cantidades de acrilamida a partir de asparagina. Además, los estudios mecanísticos utilizando asparagina marcada isotópicamente

con ^{15}N y ^{13}C , confirmaron que el nitrógeno del grupo amida y los tres átomos de carbono de la acrilamida derivan de la molécula de asparagina (Zyzak y col., 2003).

Varios estudios proporcionaron más evidencias sobre estas posibles rutas de formación. La base de Schiff puede descarboxilar al intermedio iluro de azometina (**II**) a través de la forma zwitteriónica (**IIa**) (Zyzak y col., 2003), o a través del intermedio oxazolidina-5-ona por ciclación intramolecular (**IIb**) (Yaylayan y col., 2003). El iluro de azometina puede sufrir fácilmente prototropía 1,2 conduciendo a las iminas 1 y 2 y como esta prototropía es irreversible, las dos aminas no son interconvertibles. La imina 1 puede hidrolizarse (**IIIa**) y formar el aminoácido descarboxilado 3-aminopropionamida (Stadler y col., 2004). Granvogl y Schieberle han demostrado que se forma acrilamida a partir de 3-aminopropionamida mediante eliminación del amoníaco (Granvogl y Schieberle, 2006). Por otro lado, la tautomerización del iluro de azometina (**IV**) conduce al producto de Amadori descarboxilado, seguido de la rotura del enlace carbono-nitrógeno como consecuencia de una β -eliminación y formación posterior de acrilamida (Stadler y col., 2004). La imina 2 por hidrólisis (**IIIb**) proporciona el aldehído de Strecker de la asparagina (3-oxopropanamida). Sin embargo, este aldehído no produce cantidades elevadas de acrilamida (Stadler y col., 2004).

No sólo los azúcares reductores pueden actuar como fuente de grupo carbonilo para formar acrilamida, también los α -dicarbonílicos o cualquier otro compuesto carbonílico (Mottram y col., 2002; Zyzak y col., 2003; Schieberle y col., 2005; Amrein y col., 2006a). La naturaleza del compuesto carbonílico es importante para determinar el grado en que se producen las diferentes vías de formación y por tanto, el rendimiento. En sistemas modelo se ha demostrado que los compuestos α -hidroxicarbonílicos (como la fructosa o la glucosa) son mucho más eficientes en convertir asparagina a acrilamida que los α -dicarbonílicos (como la butanodiona o el glioxal). Esto puede explicarse porque la presencia de un grupo hidroxilo en posición β al átomo de nitrógeno de la base de Schiff favorece la reorganización de la imina 1 (tautomerización) al producto de Amadori descarboxilado (**IV**). Para los compuestos α -dicarbonílicos, la vía **IIIb** está mucho más favorecida que la **IIIa**, debido a la tendencia del grupo carbonilo en la posición β al átomo de nitrógeno a deslocalizar la carga negativa. Como se mencionó anteriormente, la vía **IIIb**, no libera grandes cantidades de acrilamida (Stadler y col., 2004). Amrein y col., mostraron resultados opuestos, encontrando 300 veces más cantidad de acrilamida en el sistema modelo glioxal-asparagina que en otro similar con glucosa o fructosa (Amrein y col., 2006a). Otro estudio ha confirmado que el glioxal también es muy reactivo frente a la asparagina para producir acrilamida (Koutsidis y col., 2008). Más recientemente se

ha publicado la contribución del HMF a la formación de acrilamida en presencia de asparagina. Los investigadores observaron que el sistema modelo glucosa-HMF genera acrilamida más eficientemente que los sistemas glucosa-asparagina (Glu-Asn), sugiriendo que el HMF es un compuesto carbonílico capaz de acelerar la formación de acrilamida en sistemas modelo de baja humedad (Gökmen y col., 2012).

Como se ha comentado, el iluro de azometina y el producto de Amadori descarboxilado son intermedios clave. Perez-Locas y col. sintetizaron ambos compuestos y estudiaron su capacidad para generar acrilamida tanto en condiciones de alta como de baja humedad (Perez-Locas y Yaylayan, 2008b). En ambas condiciones, la base de Schiff posee una elevada capacidad para dar lugar a acrilamida. En el sistema modelo de baja humedad, el aumento es casi cuatro veces mayor que el correspondiente producto de Amadori descarboxilado o la 3-aminopropionamida. Sin embargo, en condiciones de humedad, es de 2 veces en relación al producto de Amadori descarboxilado, pero más de 20 veces con respecto a la 3-aminopropionamida.

Por último, cabe resaltar que el rendimiento de la reacción no es muy alto, menos del 1% de asparagina libre se convierte a acrilamida (Becalski y col., 2003). Sin embargo, el bicarbonato amónico podría aumentar la tasa de conversión hasta el 5% (Amrein y col., 2006a). No obstante, los rendimientos de reacción son difíciles de predecir, ya que la acrilamida se puede degradar tanto a través de reacciones de polimerización como de reacciones de adición tipo Michael (Mottram y col., 2002; Koutsidis y col., 2009; Zamora y col., 2011). En este sentido, los sistemas modelo cinéticos, que se explicarán en el apartado 2.8, se han utilizado como una forma de cuantificar de manera simplificada la formación y la degradación de la acrilamida.

2.4.2. Rutas alternativas

Como se ha comentado anteriormente, el principal mecanismo para la formación de acrilamida en los alimentos es la reacción de asparagina y azúcares reductores mediante la RM. Sin embargo, hay otras rutas que juegan un papel menor y, por tanto, solo se describen brevemente.

- Acroleína

La acroleína es un aldehído α,β -insaturado que puede ser producido a partir de los lípidos (triglicéridos) mediante tratamiento térmico fuerte. Se han encontrado pequeñas cantidades

de acroleína en algunos alimentos, tales como los fritos, los aceites de cocina y el café tostado. Yasuhara y col. han demostrado que la acrilamida puede formarse a partir de la acroleína por dos vías (Yasuhara y col., 2003). En la primera, el ácido acrílico producido a partir de acroleína reacciona con el amoníaco (producido a partir de los α -aminoácidos a través de la degradación de Strecker en presencia de compuestos carbonílicos) y forma acrilamida. La segunda vía conlleva la participación de radicales para generar acrilamida.

- Ácido acrílico

El ácido acrílico se puede formar por la descomposición térmica del ácido aspártico, carnosina y β -alanina (Stadler y col., 2003; Yaylayan y Stadler, 2005). Se puede generar indirectamente a partir de la serina y la cisteína a través de la formación de ácido pirúvico. El ácido acrílico, reacciona con el amoníaco disponible para formar acrilamida y su formación se ve limitada por la disponibilidad del amoníaco en los alimentos (Yaylayan y col., 2005).

- 3-Aminopropionamida

La 3-aminopropionamida puede ser un intermediario en la RM entre la asparagina y los azúcares reductores (Figura 10), como se comentará en el Artículo 3.1 del **Capítulo 3**, o puede formarse también a partir de la descarboxilación enzimática de la asparagina, mediante la descarboxilación de la base de Schiff, a través de la base de Schiff formada entre Asn y un compuesto α -hidroxicarbonílico o bien por reacción con el ácido pirúvico (Granvogl y col., 2006; Schieberle y col., 2005). Además, es un precursor de la acrilamida muy eficaz en ausencia de catalizadores como los compuestos carbonílicos (Granvogl y Schieberle, 2007).

- Oxidación lipídica

Diferentes estudios han demostrado que los lípidos oxidados compiten muy eficientemente con los hidratos de carbono por las reacciones carbonil-amina, y que los mismos productos se producen generalmente tanto a partir de carbohidratos como a partir de lípidos a través de reacciones idénticas o muy similares (Zamora e Hidalgo, 2005). Una amplia gama de lípidos oxidados son capaces de degradar los aminoácidos a sus correspondientes aldehídos de Strecker (Hidalgo y col., 2005; Zamora y col., 2007) y a sus derivados vinílogos (Zamora e Hidalgo, 2008). Entre ellos, el 2,4-decadial es el que presenta un grado de reactividad mucho mayor para convertir asparagina en acrilamida que otros lípidos oxidados. El mecanismo de esta reacción parece tener lugar en dos etapas principales, la descarboxilación del aminoácido asparagina (Hidalgo y col., 2010a) y la posterior desaminación de la 3-aminopropionamida (Zamora y col., 2009).

2.5. Métodos analíticos

Para cuantificar el grado de contaminación en el alimento y definir las posibles estrategias de mitigación de la formación de acrilamida, es imprescindible disponer de métodos analíticos fiables y selectivos para detectar su presencia en una gran variedad de alimentos. Todo ello hace que el desarrollo de un método universal de análisis suponga un reto para la comunidad científica.

Brevemente, el análisis de la acrilamida conlleva varias etapas: extracción, derivatización (dependiendo del sistema de análisis), purificación, concentración y análisis instrumental, las cuales se detallan a continuación.

2.5.1. Extracción y purificación

Debido a la alta solubilidad de la acrilamida en agua, se utiliza este medio para realizar su extracción de los alimentos. De manera general, la extracción se lleva a cabo a temperatura ambiente aunque también se ha realizado a 60-80 °C en el caso de matrices grasas como el chocolate, con el fin de promover la dispersión y una extracción efectiva. No obstante, temperaturas elevadas no suponen una mejora en los rendimientos de extracción e incluso puede generarse un extracto que podría obstruir las columnas de SPE. Posteriormente, la muestra es homogenizada con la fase acuosa mediante agitación horizontal, rotacional, o bien mediante vórtex o blender.

Para controlar los porcentajes de recuperación y realizar un seguimiento de posibles pérdidas durante las etapas de extracción y purificación, es habitual incorporar un patrón interno a la muestra. La mayoría de los trabajos publicados emplean [$^{13}\text{C}_3$]-acrilamida aunque también se han utilizado [$^{13}\text{C}_1$]-acrilamida, [D_3]-acrilamida, *N,N*-dimetilacrilamida, [$^2\text{H}_3$]-acrilamida y metacrilamida.

Antes de hablar del proceso de purificación, es preciso destacar que algunos autores incluyen una etapa de desengrasado previa a la etapa de extracción o en combinación con ella, para evitar la influencia de las grasas en el análisis, fundamentalmente en matrices como patatas fritas, chocolate, café, etc. Ésta se lleva a cabo con disolventes orgánicos como hexano, éter de petróleo o ciclohexano. Además, a los alimentos ricos en proteínas se les añade metanol, acetonitrilo o una solución salina, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] + \text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, para desproteinarlos. Después de la extracción, la fase acuosa se centrifuga o se ultrafiltra (Keramat y col., 2011).

En cuanto a los procedimientos de purificación, la mayoría de ellos combina varias etapas de SPE. Una alternativa interesante puede ser el empleo de un único cartucho de extracción, como por ejemplo el Oasis HLB, basado en un relleno humectable de fase inversa con un equilibrio hidrofílico-lipofílico (Roach y col., 2003; Arribas-Lorenzo y col., 2009) o el Oasis MCX con modo mixto intercambio catiónico-fase inversa (Gökmen y col., 2009). El extracto obtenido se analiza posteriormente, principalmente mediante GC-MS o LC-MS/MS.

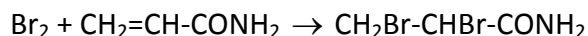
A continuación se resumen los métodos cromatográficos para el análisis de acrilamida.

2.5.2. Cromatografía de gases-espectrometría de masas

La acrilamida es un compuesto poco adecuado para el análisis por GC-MS por varias razones. En primer lugar, los disolventes polares, preferentemente agua, que se requieren para efectuar una buena extracción de los alimentos no están bien adaptados para la preconcentración y la inyección en una columna capilar. En segundo lugar, porque la acrilamida es muy polar y tiene una baja volatilidad en comparación a su peso molecular. Y por último, como es una molécula pequeña con un peso molecular de 71,08 g/mol proporciona un espectro de masas pobre.

El análisis de acrilamida puede llevarse a cabo de forma directa sin derivatización de la molécula o mediante bromación.

Los métodos mediante derivatización se remontan a la década de 1990 (Castle, 1993) y se componen de una extracción acuosa a partir de la matriz seguida de la derivatización de la acrilamida al 2,3-dibromopropionamida:



La derivatización podría hacerse con una solución acuosa de bromo elemental o mediante el uso de KBrO_3 y KBr que son más seguros. Posteriormente, el derivado se extrae con acetato de etilo el cual puede ser inyectado directamente mediante GC-MS o bien ser purificado o preconcentrado para conseguir límites de detección más bajos. Aunque la derivatización es larga y tediosa, esta metodología presenta múltiples ventajas entre las que destacan: mejora en la selectividad y sensibilidad, eliminación de los interferentes co-extractivos y aumento en la volatilidad. Por lo general los iones monitorizados son m/z 150/152 $[\text{CH}_2\text{CHBrCONH}_2]^+$ y m/z 106/108 $[\text{CH}_2\text{CHBr}]^+$. Algunos investigadores optan por convertir el dibromo derivado a 2-

.....

bromopropenamida por tratamiento con trietilamina. Este paso adicional evita el riesgo de una deshidrobromación en el inyector o en la fuente de iones del MS sin disminuir la selectividad o la sensibilidad del método. En cuanto a la separación, se realiza en columnas capilares de polaridad media-alta. El empleo de GC-MS/MS o acoplamiento a un espectrómetro de masas de alta resolución puede reducir el límite de detección para ciertos alimentos, acercándose al rango de 1-2 µg /kg.

No obstante, se han desarrollado métodos analíticos para su análisis de forma directa (Biedermann y col., 2002a). En gran parte debido a que ofrecen un mayor rendimiento de muestra, evitando el tiempo consumido en la etapa de bromación, además de reducir el uso de productos corrosivos y peligrosos. El proceso consiste en la extracción del analito con disolventes orgánicos seguido de una limpieza de la muestra mediante extracción líquido-líquido con o sin el uso de un absorbente. Las columnas para la separación cromatográfica y la detección mediante monitorización de iones seleccionados (SIM) son polares del tipo Carbowax. Una revisión extensa sobre los métodos basados en GC-MS para el análisis de acrilamida incluyendo la derivatización fue redactada por Castle y col. (Castle y col., 2005).

2.5.3. Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas

El primer método de LC-MS para el análisis de acrilamida en alimentos se desarrolló a principios del 2002 por Rosén y Hellenäs (Rosén y col., 2002) para verificar los resultados iniciales obtenidos en Suecia mediante GC-MS. Generalmente, conlleva la extracción acuosa de acrilamida a partir de la matriz del alimento seguido de una o varias etapas de SPE utilizando rellenos tanto de fase inversa como de intercambio iónico. Finalmente, la separación cromatográfica se realiza mediante HPLC con columnas de grafito, fase inversa o intercambio iónico. En cuanto al sistema de detección, la mayoría de los trabajos publicados emplean la espectrometría de masas con un analizador de triple cuadruplo con ionización positiva por *electrospray* (ESI) y en menor medida APCI. No obstante, y debido al alto coste de este sistema ha sido necesario desarrollar métodos basados en un único cuadrupolo en modo SIM, con los cuales se han obtenido también buenos límites de detección para la mayoría de las matrices alimentarias.

Hay que tener en cuenta que debido al bajo peso molecular de la acrilamida y por tanto de sus fragmentos iónicos, la confirmación se logra monitorizando más de una transición característica. Sin embargo, ya que la acrilamida es una molécula muy polar con escasa

retención en los rellenos convencionales de fase inversa, y a pesar del uso de un espectrómetro de masas en tándem operando mediante monitorización de reacciones seleccionadas (SRM), debe realizarse un esfuerzo adicional en las etapas de purificación para evitar la interferencia de co-extractivos. Finalmente, la identificación se basa en el tiempo de retención cromatográfico y en la presencia y abundancia relativa de los iones característicos (Figura 11).

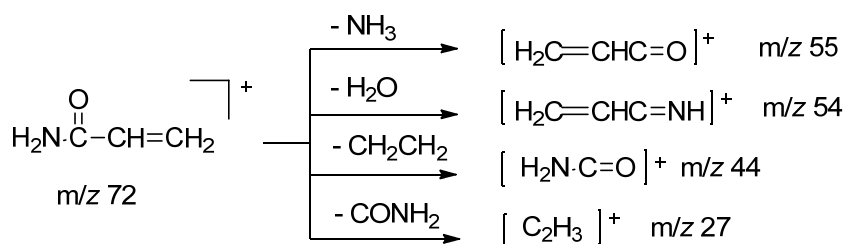


Figura 11. Fragmentaciones del ion acrilamida (m/z 72).

2.5.4 Otros métodos analíticos

Para la detección y cuantificación de acrilamida mediante LC, es frecuente la utilización de UV (Paleologos y Kontominas, 2005) o detector de diodos (DAD) (Gökmen y col., 2005) como detectores a longitudes de onda de 210 y 225 nm. Además, la detección electroquímica de impulsos se ha desarrollado también para este fin (Casella y col., 2006). En el caso de la GC, la detección por captura electrónica (ECD) se aplica extensamente debido a su alta sensibilidad. Asimismo, se han obtenido resultados satisfactorios cuando se han aplicado otras técnicas como la microextracción en fase sólida (SPME) y la dispersión en matriz en fase sólida (MSPD) (Soares y col., 2010).

Con respecto a las técnicas de electroforesis capilar, la cromatografía electrocinética con microemulsión (Bermudo y col., 2004), así como la electroforesis capilar en zona después de la derivatización con 2-mercaptobenzoico se han utilizado con buenos resultados. La cromatografía de líquidos y gases combinada con el analizador de tiempo de vuelo acoplado a la espectrometría de masas (TOF-MS) se ha utilizado del mismo modo para el análisis de la acrilamida en muestras de alimentos (Dunovska y col., 2006; Bermudo y col., 2008). Otro progreso en este área ha sido la estimación de la acrilamida utilizando un modelo matemático y algorítmico a través del uso de la espectroscopia de infrarrojo cercano (Pedreschi y col., 2010) y el análisis de imágenes por ordenador (Gökmen y col., 2008, Gökmen y Mogol, 2010). En

comparación con los métodos experimentales, estos modelos son más rápidos y cómodos, especialmente cuando son aplicados para realizar una estimación preliminar.

A modo de resumen, en las Tablas 13 y 14 se recogen las características más importantes de los principales métodos descritos en la bibliografía aplicados al análisis de acrilamida, basados tanto en la cromatografía líquida de alta eficacia como en la cromatografía de gases.

Matriz	Patrón interno	Tratamiento de la muestra	Columna	Método LOD LOQ	Referencia
Pan tostado Patatas fritas (aperitivo)	[² H ₃]- acrilamida	Extracción con agua, centrifugación, centrifugación extra para patatas, precipitación por congelación, purificación con SPE, filtración (0,22 µm)	Hypercarb 50 mm × 2,1 mm, 5 µm	LC-MS/MS LOD <10 µg/kg LOQ <30 µg/kg	Rosén y col., 2002
Patatas fritas (aperitivo), patatas fritas, cereales, pan y café	[¹³ C ₃]- o [D ₃]- acrilamida	Extracción con agua y CH ₂ Cl ₂ , agitación 15 min, centrifugación, SPE con cartuchos Oasis MAX, Oasis MCX, y ENVI-carb	Hypercarb 150 mm × 2,1 mm, 5 µm	LC-MS/MS LOD 6 µg/kg	Becalski y col., 2003
Cereales, miga de pan, patatas fritas (aperitivo), café	[¹³ C ₃]- acrilamida	Extracción con agua, agitación 15 min, centrifugación, purificación con Oasis HLB	Synergi Hydro-RP 250 mm × 2 mm, 4 µm	LC-ESI-MS/MS LOD 10 µg/kg	Roach y col., 2003
Patatas fritas (aperitivo), patatas fritas, cereales, productos de panadería, nueces y café	[² H ₃]- acrilamida	Desengrasado con iso-hexano, incubación 30 min, extracción con agua en ultrasonidos, (60 °C, 30 min), purificación con acetonitrilo y soluciones Carrez, centrifugación, filtración	Merck LiChrospher 100 CN 250 mm × 4 mm, 5 µm	LC-MS/MS LOD < 10 µg/kg LOQ < 30 µg/kg	Hoenicke y col., 2004
Productos horneados y matrices de patata	[¹³ C ₃]- acrilamida	Etapas de extracción con agua acidificada sin clean-up	Columna C ₁₈	LC-MS/MS LOD < 15 µg/kg LOQ < 25 µg/kg	Calbani y col., 2004
Café	[¹³ C ₃]- acrilamida	Extracción con agua, agitación en vórtex 30 s, centrifugación, la alícuota es transferida a un tubo de filtración Maxi-Spin PVDFb (0,45 µm), centrifugación, SPE: Oasis HLB y Bond Elut Accucat	Synergi Hydro RP 80A 250 mm × 2 mm, 4 µm	LC-MS/MS LOD 10 µg/kg	Andrzejewski y col., 2004
Patatas fritas (aperitivo)	[¹³ C ₃]- acrilamida	Extracción con metanol, centrifugación, purificación con soluciones Carrez, evaporación y reconstitución en agua, SPE: Oasis HLB	Atlantis dC18 250 mm × 4,6 mm, 5 µm	LC-DAD LOD 4 µg/kg	Gökmen y col., 2005

Matriz	Patrón interno	Tratamiento de la muestra	Columna	Método LOD LOQ	Referencia
Café, cacao, galletas y patatas	Metacrilamida	Extracción con agua a 70 °C y hexano Derivatización: hidrólisis a ácido acrílico/ácido metacrílico	Aminex HPX 87H 300 mm × 7,8 mm	LC-UV LOD 15 µg/kg LOQ 45 µg/kg	Paleologos y col., 2005
Fórmulas infantiles	[¹³ C ₃]-acrilamida	Extracción con solución acuosa de NaCl, extracción líquido-líquido con acetato de etilo/Oasis HLB	Atlantis dC ₁₈ 250 mm × 4,6 mm, 5 µm	LC-MS/MS	Jiao y col., 2005
Cereales, galletas, pan, cacao, alimentos infantiles, etc.	[¹³ C ₃]-acrilamida	Extracción con agua y purificación con soluciones Carrez	Inertsil ODS-3 250 mm × 4,6 mm, 5 µm	LC-MS (APCI) LOD 6-10 µg/kg LOQ 15-20 µg/kg	Senyuva y col., 2005
Patatas fritas (aperitivo), patatas fritas, galletas, frutos secos, chocolate, café, pan, etc.	[² H ₃]-acrilamida	Extracción con agua, SPE: Strata-X-C 200 mg y ENV ⁺ 200 mg	ODS-80-TS 150 mm × 2,1 mm, 5 µm	LC-MS/MS, Trampa iones APCI LOD 45 µg/kg	Bermudo y col., 2006
Patatas fritas (aperitivo)	[¹³ C ₃]-acrilamida	Extracción con NaCl a 60 °C, tratamiento con Carrez, SPE: Oasis HLB + MCX (200 mg + 60 mg) o Isolute MM, 500 mg	Extrasyl ODS1 200 mm × 3,0 mm, 5 µm	LC-MS, SIM LOQ 70 µg/kg	Rufián-Henares y Morales, 2006
Café, patatas fritas (aperitivo)		Extracción con agua a 60 °C, tratamiento con Carrez, SPE con cartuchos Strata X-C	Synergi Hydro-RP 250 mm × 4 mm	LC-detector electroquímico	Casella y col., 2006
Galletas, café, pan, patatas fritas (aperitivo)	[¹³ C ₃]-acrilamida	Extracción con agua, agitación, centrifugación, purificación con cartuchos C ₁₈	Aqua C ₁₈ 250 mm × 2,0 mm, 5 µm	LC-MS/MS, LOQ 2 µg/kg	Kim y col., 2007
Alimentos ricos en hidratos de carbono	[¹³ C ₃]-acrilamida	Desengrasado, extracción acuosa con NaCl, extracción líquido-líquido con acetato de etilo, evaporación, SPE con Oasis HLB	Atlantis dC ₁₈ 250 mm × 4,6 mm, 5 µm	LC-MS/MS LOQ < 2 µg/kg	Zhang y col., 2007

Matriz	Patrón interno	Tratamiento de la muestra	Columna	Método LOD LOQ	Referencia
Té	[¹³ C ₃]- acrilamida	Extracción con agua, agitación, añadir acetonitrilo seguido de sulfato magnésico anhidro y NaCl, SPE con Oasis MCX	ODS-C ₁₈ 250 mm × 4,6 mm, 5 µm	LC-MS/MS LOD 1 ng/mL LOQ 5 ng/mL	Liu y col., 2008
Alimentos fritos a base de harina		Extracción con agua, centrifugación (0 °C) y SPE con cartuchos Oasis HLB y Bond Elut-Accucat	Alltima C ₁₈ 150 mm × 2,1 mm, 3 µm	LC-UV LOD 6 µg/kg LOQ 23 µg/kg	Wang y col., 2008
Churros	[¹³ C ₃]- acrilamida	Extracción con agua, vórtex, soluciones Carrez, centrifugación, SPE con Oasis HLB	Inertsil ODS-3 250 mm × 4,6 mm, 5 µm	LC-MS, SIM LOQ 18 µg/kg	Morales y Arribas- Lorenzo, 2008
Patatas fritas (aperitivo), café, galletas, carne a la parrilla y pollo		Desengrasado. Extracción con soluciones Carrez y ácido acético, agitación, centrifugación.	Zorbax SB-C ₁₈ 250 mm × 4,6 mm, 5 µm	LC-MS LOD 0,5 µg/L LOQ 5 µg/L	Kaplan y col., 2009
Galletas, patatas fritas (aperitivo) pan	[¹³ C ₃]- acrilamida	Extracción con agua o metanol, soluciones Carrez, y SPE con Oasis MCX	Atlantis T3 150 mm × 4,6 mm, 3 µm	LC-MS LOQ 15 µg/kg	Gökmen y col., 2009
Productos a base de patata y maíz	[D ₃]- acrilamida	Desengrasado con hexano, extracción con agua, ultrasonidos (15 min, 60 °C), adición de acetonitrilo, clean-up con soluciones Carrez y posterior centrifugación	Lichrospher 100 CN 250 × 4 mm, 5 µm	LC-MS/MS LOD <10 µg/kg LOQ <30 µg/kg	Borouhaki y col., 2010
Material de referencia certificado de patatas fritas (aperitivo)	[¹³ C ₃]- acrilamida	Extracción con agua, SPE con Oasis HLB y Oasis MCX	Symmetry 300 C4 150 mm × 4,6 mm, 5 µm	LC-MS dilución isotópica	Kim y col., 2010
Patatas fritas (aperitivo)		Extracción con agua, vórtex y sonicación, adición isopropanol, centrifugación, evaporación del sobrenadante, reconstitución en acetonitrilo, desengrasado con hexano	EC/2 Nucleodur 100-5 C ₁₈ 150 mm × 2 mm, 5 µm	LC-ESI-MS/MS LOD 6 µg/kg LOQ 18 µg/kg	Tateo y col., 2010

Tabla 13. Métodos de análisis de acrilamida basados en LC. LOD: Límite de detección. LOQ: Límite de cuantificación.

Matriz	Patrón interno	Tratamiento de la muestra	Derivatización	Columna	Método LOD LOQ	Ref.
Patatas, <i>snacks</i> de maíz, té	[¹³ C ₃]-acrilamida	Desengrasado, extracción con agua a temperatura ambiente, extracción con acetato de etilo y fraccionación en cartuchos Florisil	Bromación con KBr y KBrO ₃ , 90 min, refrigeración	DB-WAX 30 m × 0,25 mm, 0,25 μm	GC-MS, SIM LOD 9 μg/kg LOQ 30 μg/kg	Nemoto y col., 2002
Alimentos procesados	[² H ₃]-acrilamida	Extracción con agua, homogenización y centrifugación	Bromación	CP-Sil 24 CB Lowbleed/MS	GC-MS LOD 0,2 ng/mL LOQ 0,8 ng/mL	Ono y col., 2003
Varios alimentos	[² H ₃]-acrilamida	Desengrasado con iso-hexano, extracción con agua en ultrasonidos (60 °C), purificación con acetonitrilo y soluciones Carrez		DB-Wax 30 m × 0,25 mm, 0,25 μm	GC-MS/MS LOQ 30 μg/kg	Hoenicke y col., 2004
Pan	[¹³ C ₃]-acrilamida	Extracción con agua, agitación 1 min, 0,3 mL ácido acético glacial, purificación con soluciones Carrez	Bromación	Rtx-50 30 m × 250 μm	GC-MS/MS LOD 0,01 ng/mL	Hamlet y col., 2004
Patatas fritas (aperitivo), cereales desayuno, pan	[D ₃]-acrilamida	Extracción con agua y n-propanol, evaporación, adición de acetonitrilo, desengrasado con hexano, adición del sorbente amina primaria-secundaria		Innowax 30 m × 0,25 mm	GC-TOF-MS LOQ 15 y 40 μg/kg	Dunovsa y col., 2006
Patatas fritas y de aperitivo		Extracción con agua, centrifugación, adición a 1,5 mL del sobrenadante de agua, mezclar con 15 mL de buffer, inmersión directa en fibra SPME		DW-WAX silica 30 m × 0,25 mm	SPME-GC-MS/MS LOD 0,1 μg/L	Lee y col., 2007
Alimentos ricos en hidratos de carbono	[¹³ C ₃]-acrilamida	Homogenización, desengrasado con éter de petróleo, extracción con solución acuosa de NaCl	Bromación	HP Innowax 30 m × 0,32 mm	GC-detector de microcaptura electrónica LOD 10 μg/kg	Zhang y col., 2007

Matriz	Patrón interno	Tratamiento de la muestra	Derivatización	Columna	Método LOD LOQ	Ref.
Alimentos procesados		Desengrasado con hexano, extracción con agua, extracción líquido-líquido con acetato de etilo después de la derivatización	Bromación	SupelcoWax-10 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm	GC-ECD LOD 0,6 µg/kg LOQ 2 µg/kg	Zhu y col., 2008
Pan, cereales de desayuno, <i>snacks</i> , galletas, chocolate, alimentos infantiles	[¹³ C ₃]-acrilamida	Dispersión de la muestra con fase sólida C ₁₈ , la mezcla es empaquetada en columna SPE y la acrilamida es extraída con agua	Bromación con KBr, HBr y solución saturada de bromo	MDN-12 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm	MSPD/GC-MS/MS LOD 5 µg/kg LOQ 16 µg/kg	Soares y col., 2009
Café	[¹³ C ₃]-acrilamida	Dispersión de la muestra con fase sólida C ₁₈ , la mezcla es empaquetada en columna SPE de doble capa (C ₁₈ /Multimode; 1 g + 1 g) y la acrilamida es extraída con agua	Bromación	MDN-12 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm	MSPD/GC-MS LOD 5 µg/kg LOQ 10 µg/kg	Soares y col., 2010

Tabla 14. Métodos de análisis de acrilamida basados en GC.

2.5.5. Materiales de referencia certificados

La comparación de los resultados analíticos y el aseguramiento de la precisión no es una tarea fácil en el análisis de acrilamida en matrices complejas. De ahí que las autoridades competentes hayan hecho especial hincapié en la necesidad de utilizar materiales de referencia certificados (MRC) como herramienta útil para la precisión y la trazabilidad de los resultados analíticos. Los MRC se pueden emplear para la validación de los métodos de análisis desarrollados en los laboratorios con el fin de asegurar la calidad y la competencia técnica.

La producción de un material de referencia sigue principalmente la Guía ISO 34:2000 y la Guía ISO 35:2006, las cuales incluyen el tratamiento de los materiales, la homogeneidad, la evaluación de la estabilidad, la caracterización y la asignación del valor analítico (ISO Guide 34, 2000; ISO Guide 35, 2006). La organización FAPAS (*Food Analysis Performance Assessment Scheme*) lleva organizando anualmente ejercicios de intercomparación en diferentes matrices y analitos. La primera ronda de ensayos de aptitud sobre acrilamida (FAPAS 3001) se llevó a cabo en julio de 2002 utilizando una muestra de pan tostado. De la misma manera, otras organizaciones también han desarrollado pruebas de aptitud sobre acrilamida. El IRMM ha llevado a cabo varios ensayos de intercomparación a nivel europeo desde julio de 2003. Además, el Instituto Federal Alemán para la Evaluación de Riesgos (BfR) organizó su primera prueba en abril de 2003 y la FDA-JIFSAN organizó un ejercicio de control en la primavera de 2004.

Es preciso resaltar que nuestro grupo de investigación ha participado activamente en varios ejercicios obteniendo resultados satisfactorios en las matrices alimentarias objeto de estudio de la presente Memoria, como se describe en el Anexo I.

2.6. Efecto de la tecnología del procesado

2.6.1. Influencia de la materia prima

- Productos a base de patata

En las patatas, la asparagina es el aminoácido libre más abundante (~ 40%) y su concentración (~ 3400 mg/kg) es más del doble del total de azúcares reductores (~ 1600 mg/kg) (Amrein y col., 2004a). Varios investigadores observaron que los niveles de acrilamida están relacionados con las concentraciones de glucosa y fructosa en las patatas (Becalski y col, 2004; Sanny y col., 2010). Se han encontrado diferencias considerables en los niveles de azúcares entre patatas de una misma variedad. Se ha establecido que el almacenamiento del producto a temperaturas

inferiores a 10 °C produce un aumento en los azúcares reductores y por tanto, se favorece la formación de acrilamida durante los procesos de fritura y durante el asado (Sanny y col., 2010). Este efecto puede minimizarse mediante un reacondicionamiento después del almacenamiento y siempre previo al procesado.

Por otro lado, la bibliografía describe una relación inversa entre la cantidad de fertilizante nitrogenado empleado en el cultivo de patata y el contenido de acrilamida, ya que cuando se utiliza una menor cantidad, los niveles de azúcares reductores se elevan mientras que la proteína cruda y los niveles de aminoácidos libres disminuyen (De Wilde y col., 2006). Sin embargo otros autores no observaron ninguna relación con el tipo de fertilizante empleado (Amrein y col., 2004a).

Independientemente de la fertilización, las condiciones climáticas es otro factor que puede influir en la formación de acrilamida. De forma general, y basándose en los diferentes trabajos publicados hasta la fecha, se puede concluir que es posible reducir el contenido de acrilamida de los productos de patata a través de unas buenas prácticas agrícolas así como seleccionando cuidadosamente variedades de patata con bajos niveles de azúcares reductores.

- Productos a base de cereales

En los cereales, la asparagina es el factor limitante en la formación de acrilamida ya que la concentración de azúcares reductores, dependiendo de la variedad, puede ser de 10 a 50 veces mayor que la de asparagina (Konings y col., 2007; Seal y col., 2008). En consecuencia, no se ha encontrado correlación entre azúcares reductores y el contenido de acrilamida (Claus y col., 2006a). Los niveles de asparagina varían dependiendo de la variedad y del tipo de cereal utilizado. El centeno es el cereal que posee mayor contenido en asparagina, alrededor de cuatro veces más que el trigo (centeno: 634 mg/kg; trigo: 174 mg/kg). Sin embargo el arroz es el que menor contenido tiene (< 100 mg/kg), mientras que el maíz y la avena tienen un contenido intermedio (150 mg/kg) (Seal y col., 2008). Además, los niveles de asparagina libre varían dependiendo de la fracción del grano, con el nivel más bajo en el endospermo debido a que el grano queda más refinado al eliminarse las capas más externas, siendo más alto en el salvado (Springer y col., 2003, Claus y col., 2006b).

Los fertilizantes también tienen influencia. En el caso de los fertilizantes nitrogenados, su uso durante el crecimiento de los cultivos de cereales provoca un aumento de los niveles de aminoácidos y del contenido en proteína en el grano, lo que se traduce en un aumento de los

niveles de acrilamida en productos de panadería (Claus y col., 2006a). Por lo tanto, la fertilización nitrogenada debe ajustarse a los requisitos mínimos de los cultivos. En el caso de los fertilizantes sulfurados, se ha observado que cuando el trigo crece en condiciones de deficiencia de azufre, las concentraciones de asparagina libre son mayores (Curtis y col., 2009).

- Café

El café está considerado como un producto de un solo ingrediente, se obtiene únicamente a partir del tostado del grano de café verde, es decir, sin la adición de otros ingredientes. Las concentraciones de asparagina se encuentran dentro de un rango muy estrecho, por lo general de 20 a 100 mg/100 g (CIAA, 2011). En general, la variedad de café robusta contiene cantidades ligeramente mayores de asparagina que la variedad arábica, y por tanto, la concentración esperable de acrilamida es superior (Seal y col., 2008).

En cuanto a los azúcares, éstos están presentes en los granos de café verde (arábica, robusta) en mayor abundancia que la asparagina libre. Los contenidos de sacarosa oscilan entre 30 y 100 g/100 g, mientras que los de la glucosa o la fructosa son inferiores a 1 g/100 g. Los azúcares se descomponen rápidamente durante el proceso de tostado contribuyendo a la formación de productos avanzados de la RM como las melanodinas. El efecto de las melanoidinas del café sobre la absorción de acrilamida son objeto de estudio en la actualidad (Pastoriza y col., 2012).

2.6.2. Proceso de fritura

Los factores de mayor importancia en la formación de acrilamida en los alimentos son la temperatura y el contenido final de humedad. La formación de acrilamida se inicia a temperaturas superiores a 120 °C, y alcanza un máximo alrededor 170-180 °C (Tareke y col., 2002). Sin embargo, a altas temperaturas (180 °C-200 °C), el aumento drástico de los niveles de acrilamida es seguido por una rápida disminución de éstos debido a las reacciones de degradación de la acrilamida (Sanny y col., 2010). Obviamente, el descenso en la temperatura de fritura se traduce en una menor cantidad de acrilamida, pero se producen efectos negativos en la calidad del producto, como una mayor absorción de grasa y una peor textura (Romani y col., 2008).

Como se ha comentado, controlar el contenido final de humedad en el producto es importante. Diferentes autores han observado un aumento en la velocidad de formación de acrilamida a

bajos contenidos de humedad, mientras que a medida que estos aumentan disminuye la velocidad de reacción (De Vleeschouwer y col., 2007). Tanto una temperatura elevada como un tiempo de procesado mayor conlleva a un menor contenido de humedad en el producto. Como resultado, la formación de acrilamida se concentra en la región exterior del alimento en lugar de la región central (Gökmen y col., 2006b). Por ejemplo, en las patatas fritas, la tasa de formación no es la misma en la superficie que en el interior, como consecuencia de la diferente transferencia de calor y evaporación de agua. En realidad, la temperatura del interior no llega a superar los 100 °C, incluso durante un calentamiento prolongado a 190 °C. Sin embargo, en las patatas fritas de aperitivo la humedad en todo el producto es inferior al 2,5%, con temperaturas centrales superiores a 120 °C y por tanto, niveles más elevados de acrilamida.

Existen otros aspectos que han de tenerse en cuenta. Por ejemplo, una elevada relación superficie-volumen conduce a niveles significativamente más altos de acrilamida, ya que no sólo más precursores han estado expuestos a mayores temperaturas de superficie sino que también, todo el volumen se calienta más rápido. Por otro lado, la cantidad de muestra determina el descenso de temperatura que se produce al sumergirse el producto en el aceite y el tiempo de fritura requerido para recuperar la temperatura inicial, y por tanto, la formación de acrilamida. En general, los niveles de acrilamida disminuyen a medida que aumenta la relación de masa entre la muestra y el aceite. Esta relación debe ajustarse con el objeto de que la temperatura no baje de 140 °C y obtener así una calidad óptima en el producto (textura y sabor) a la vez que una baja concentración de acrilamida.

2.6.3. Proceso de horneado

Durante el proceso de horneado, ocurre simultáneamente una transferencia de calor y de masa que produce cambios físicos y químicos en el alimento, como por ejemplo cambios de volumen, evaporación del agua y formación de la corteza.

Al igual que en los procesos de fritura, la temperatura y la humedad son dos parámetros cruciales en el proceso de horneado. Diversos estudios han demostrado que el 99% de la acrilamida se forma en la corteza, y que los niveles aumentan con el tiempo y la temperatura (Claus y col., 2005; Keramat y col., 2011). Por el contrario, solo pequeñas trazas se han encontrado en el interior debido a que se alcanzan temperaturas de tan sólo 100 °C (Sadd y Hamlet, 2005).

Además de la temperatura, otro factor importante es la transferencia de calor a través de los hornos a la superficie del alimento. Generalmente, se emplean dos tipos de hornos, los convencionales cuya transferencia de calor se realiza mediante conducción y radiación, y los de convección que se basan en la circulación forzada de aire. Claus y col. estudiaron la influencia de estos dos hornos en la cocción de panes y observaron que los niveles de acrilamida se incrementaron notablemente cuando se utilizó un horno de convección con respecto a uno convencional (Claus y col., 2008). Esto es debido a que la circulación de aire produce un secado más rápido e intenso de la corteza. Este efecto puede, al menos en parte, evitarse mediante la aplicación de una alta humedad relativa durante el proceso de horneado (CIAA, 2011). No hay que olvidar, sin embargo, que en la mayoría de los casos, la humedad está estrechamente relacionada con el color de la superficie de la galleta, y por tanto, también con las propiedades organolépticas.

Del mismo modo, la tecnología del proceso de extrusión utilizada en la elaboración de cereales de desayuno también tiene influencia en la generación de acrilamida. Rufián-Henares y col. estudiaron el impacto de dos tecnologías diferentes de extrusión: extrusión con expansión retardada (PFEC), utilizada en la elaboración de cereales de copos, y extrusión de expansión directa (OCCS) (Rufián-Henares y col., 2006b). Este último proceso, utilizado para producir cereales de desayuno inflados, dio lugar a niveles más elevados de acrilamida comparados con el proceso de PFEC. Esto puede deberse al intenso proceso de secado e hinchado y posterior templado que tiene que ser aplicado en este tipo de cereales para equilibrar su alto contenido de humedad en un 10%. Por el contrario, otros autores (CIAA, 2006; Stadler, 2006) informaron que los niveles de acrilamida en cereales inflados se encontraban generalmente por debajo de 100 µg/kg. La extrusión gelatiniza el almidón pero apenas desarrolla color y sabor ya que el agua del cereal se evapora en la etapa final, produciendo poco o ningún tostado.

Como se demostró en estudios previos (Fredriksson y col., 2004, Lindsay y Jang, 2005), la fermentación de la masa es otro factor a tener en cuenta ya que consume elevadas cantidades del precursor asparagina libre. Por ejemplo, Claus y col. y Fredriksson y col. obtuvieron una disminución de la asparagina de un 60% y un 90%, respectivamente, en productos a base de cereales (Claus y col., 2008; Fredriksson y col., 2004). En consecuencia, la acrilamida disminuyó al mismo ritmo que la asparagina durante la primera hora de fermentación aunque posteriormente se mantuvo constante. Por lo tanto, un tiempo de fermentación de, al menos, una hora resultó ser suficiente para reducir la acrilamida en la producción de pan industrial, mientras que un tiempo superior a tres horas, resultó inadecuado debido a la degradación del

gluten y posterior aplastamiento del pan (Fredriksson y col., 2004). Además hay que tener en cuenta, que la capacidad de la levadura en la metabolización de la asparagina es limitada, por lo que más tiempo de fermentación no se traduce en una mayor reducción de acrilamida.

2.6.4. Proceso de tostado

El tostado del café es un proceso complejo, que implica la transferencia de calor a través de la estructura del grano, el transporte de vapor de agua, de CO₂ y de compuestos volátiles, así como cambios de volumen, estructura y composición. La acrilamida se forma rápidamente al comienzo del tueste. Después de alcanzar un máximo en la primera mitad del ciclo, desciende bruscamente a medida que avanza el proceso. Los niveles de acrilamida del producto final son de tan solo 20-30% del nivel máximo, por tanto, cabe esperar que un aumento en el grado de tostación produzca un café más oscuro y con un contenido de acrilamida inferior. Sin embargo, esta prolongación en los tiempos de tostado podría generar otros compuestos indeseables además de un impacto negativo en las propiedades sensoriales del producto (CIAA, 2011).

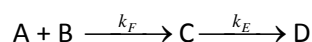
A diferencia de los otros alimentos, la concentración de acrilamida en el café disminuye con el aumento térmico y con un tostado más intenso. Esto podría deberse a las altas temperaturas aplicadas (entre 220 y 250 °C), donde las reacciones que conducen a la degradación/eliminación de la acrilamida son predominantes al final del ciclo de tostado. Sin embargo, las reacciones y el mecanismo por el cual se produce la eliminación son aún desconocidos aunque pueden ser explicados tanto por evaporación como por reacciones de degradación/polimerización (Stadler, 2006) y condensación con productos finales de la RM (Pastoriza y col., 2012).

Varios grupos de investigación han demostrado que la acrilamida no es estable en el café almacenado a temperatura ambiente en su envase original (DelaTour y col., 2004; Andrzejewski y col., 2004), registrándose pérdidas que van del 40% al 60%. La pérdida es mayor durante los primeros 2-3 meses, y depende de la temperatura de almacenamiento. Un aumento de temperatura (37 °C) conduce a una disminución más rápida que bajas temperaturas (-18 a 4 °C). Baum y col. a través de sus experimentos con ¹⁴C-acrilamida indicaron que la causa de la eliminación durante el almacenamiento podría ser debido a la interacción covalente de la acrilamida con la matriz insoluble del café (Baum y col., 2008). Estos autores no encontraron formación de aductos con los furantioles (componentes abundantes del aroma del café tostado). Más recientemente, se ha sugerido que los grupos

amino nucleofílicos de los aminoácidos participantes del esqueleto proteico de las melanoidinas podrían reaccionar via adición de Michael con la acrilamida y provocar su eliminación durante el tostado del café (Pastoriza y col., 2012).

2.7. Cinética de formación-eliminación

Los sistemas modelo basados en la cinética de formación-eliminación, describen la evolución de la reacción, con el fin de identificar las condiciones que nos permitan controlar el mecanismo. La formación de acrilamida en los alimentos puede ser representada de forma simplificada por el siguiente esquema, siendo k_F y k_E las constantes cinéticas de formación y eliminación respectivamente, a la temperatura estudiada.



A, B, C y D corresponden, respectivamente a un compuesto carbonílico (por ejemplo, un azúcar reductor), asparagina, acrilamida y sus productos de degradación.

Cuando la asparagina y el azúcar se encuentran en cantidades equimolares en el medio de reacción o en el alimento, la formación de acrilamida puede ser representada por una cinética de segundo orden. Biedermann y col. (Biedermann y col., 2002b), controlaron la eliminación de la acrilamida a través de las pérdidas de acrilamida deuterada, y propusieron una cinética de *pseudo*- primer orden para describir la eliminación. En consecuencia, el contenido de acrilamida (C_{AA}) puede ser descrito por la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_{AA}}{dt} = k_F (C_{asn} \cdot C_{azúcar}) - k_E C_{AA}$$

En otros casos se ha visto que la pérdida del azúcar es más rápida que la del aminoácido, lo que podría explicarse por el consumo del azúcar en las reacciones de caramelización además de en la RM, y por el hecho de la regeneración de la asparagina a partir de los productos iniciales de condensación y la posible formación de diglucosilamina (Martins y Van Boekel, 2005). Sobre la base de estos argumentos, la asparagina puede ser considerada en exceso, en comparación con el azúcar, y como resultado, la formación de acrilamida puede ser descrita por una cinética de formación/eliminación de primer orden:

$$\frac{dC_{AA}}{dt} = k_F C - k_E C_{AA}$$

La acrilamida empieza a formarse a temperaturas superiores a 120 °C (Mottram y col., 2002). En un principio, hay una fase de inducción en la cual no se observa acrilamida, lo que implica la formación de un producto intermedio previo a la generación de ésta. Esta fase se reduce a medida que aumenta la temperatura de reacción. A continuación, la concentración de acrilamida aumenta exponencialmente con el tiempo hasta llegar a un máximo, después del cual disminuye de nuevo, predominando por tanto en esta parte la eliminación sobre la formación. Dependiendo de la composición del sistema y los tiempos de reacción, este descenso se produce a diferentes temperaturas. Se puede observar alrededor de 140 °C en sistemas modelo de Glu-Asn (De Vleeschouwer y col., 2009a), pero en la mayoría de los casos sólo se produce a temperaturas superiores a 160 °C (Mottram y col., 2002). Esta disminución puede explicarse debido a que la acrilamida a través de su doble enlace, puede reaccionar fácilmente mediante adiciones 1,4 con nucleófilos como los grupos SH o NH₂, o los grupos de las biomoléculas presentes en el alimento o sistema modelo. Asimismo, la eliminación de la acrilamida puede deberse a la degradación de la molécula o a su polimerización (Stadler y col., 2003).

En el Artículo 3.1 del **Capítulo 3** de esta Tesis, se expone el comportamiento de la cinética de formación-eliminación de la acrilamida en un sistema modelo Glu-Asn.

En general, la reactividad de los azúcares en la reacción de formación de acrilamida disminuye con el aumento de temperatura. Desde el punto de vista químico, las aldosas (glucosa) son más reactivas que los azúcares cetosas (fructosa) debido a su grupo aldehído. Los rendimientos más bajos de acrilamida a partir de sacarosa, en comparación con la glucosa y la fructosa se pueden atribuir al hecho de que la sacarosa no es un azúcar reductor y, como tal, no puede reaccionar directamente con la asparagina para formar acrilamida, sino que primero ha de descomponerse (p.f. 190 °C) a compuestos carbonílicos reactivos.

En condiciones de baja humedad, antes de que tenga lugar la RM, se producen primero los cambios físicos. A medida que la humedad se reduce debido a la evaporación producida por el proceso de calentamiento, los azúcares disueltos inicialmente en el agua empiezan a formar una solución saturada y cristalizan. Después de la cristalización, la fusión es necesaria para cambiar su estado a líquido, y que sean reactivos. Por tanto, los azúcares reductores con un menor punto de fusión generan más acrilamida, de ahí que la fructosa (p.f. 126 °C) sea más reactiva que la glucosa (p.f. 157 °C). Sin embargo, en los sistemas líquidos, la movilidad molecular ya no es el factor limitante y la reactividad relativa del azúcar se ve determinada por

.....

su reactividad química. Pero en general, los sistemas de reacción de baja humedad suelen ser más realistas, ya que representan las últimas etapas de horneado y fritura de los alimentos (De Vleeschouwer y col., 2009b).

Además de la temperatura y la humedad, el pH puede influir en la reactividad de los precursores. A medida que transcurre la RM, se van formando H^+ que hacen que disminuyan el pH del sistema. En consecuencia, en la cinética de la acrilamida es necesario el uso de un tampón para eliminar, en la medida de lo posible, las variaciones de pH ya que se ha demostrado que si el pH disminuye se produce menos acrilamida. Esto se explica por el hecho de que la reducción del pH provoca la conversión de los grupos α -amino libres de la asparagina en grupos amino protonados, impidiendo participar posteriormente en reacciones de adición nucleofílica con compuestos carbonílicos (Zhang y Zhang, 2007) y bloqueando, por tanto, la reacción de formación de acrilamida (De Vleeschouwer y col., 2006).

2.8. Estrategias de mitigación

Una vez que se constata la formación de acrilamida durante el cocinado de los alimentos, surge la cuestión de cómo conseguir la disminución de su concentración o incluso su eliminación. Hasta la fecha se han desarrollado una gran variedad de estrategias de mitigación, la mayor parte de las cuales se han centrado principalmente en productos a base de patata (Morales y col., 2008) y de cereales (Konings y col., 2007). Sin embargo, para el caso del café y sus sucedáneos, como la achicoria, la malta o el centeno tostado, existen pocas alternativas para reducir los niveles de acrilamida sin que afecte a la calidad del producto (CIAA, 2011).

2.8.1. Precursores

Ya que los azúcares reductores y la asparagina libre son los principales precursores de la formación de acrilamida en los alimentos, una reducción de cualquiera de ellos supone una inmediata disminución de los niveles de acrilamida. Es por ello que, tratamientos de lavado, remojo y escaldado han resultado efectivos en los productos de patata (Pedreschi y col., 2007). El escaldado, por ejemplo, se aplica para minimizar la formación de zonas más tostadas de las patatas durante el calentamiento ya que extrae los azúcares reductores de la superficie además de la asparagina.

El uso de asparaginasa, una enzima que hidroliza la asparagina en ácido aspártico y amoníaco, es una de las estrategias más eficientes para reducir (hasta en un 90%) los niveles de acrilamida en patatas (Zyzak y col., 2003; Pedreschi y col., 2011) y productos de panadería

(Anese y col., 2011), además de no observarse ninguna modificación en el sabor y apariencia de los productos. Esto ha hecho que esté siendo utilizada en algunos productos a escala industrial (CIAA, 2011) aunque el alto coste supone una gran limitación. Recientemente, Pedreschi y col. han demostrado que el escaldado de patatas junto con el tratamiento con asparaginasa es una combinación efectiva para la mitigación de acrilamida (hasta un 90%) durante los procesos de fritura, ya que parece ser que provoca cambios en la microestructura de la patata conduciendo a una difusión más fácil y eficaz de la enzima (Pedreschi y col., 2011). Actualmente, están disponibles dos preparaciones comerciales de asparaginasa: *Acrylaway*® derivada del *Aspergillus oryzae* (Novozymes, Dinamarca) y *Preventase*™ producida por el *Aspergillus niger* (DSM Food Specialties, Dinamarca). Ambas fueron evaluadas positivamente por el Comité de Expertos de la FAO/OMS, y por la FDA respecto al reconocimiento GRAS (*Generally Recognized As Safe*) de la enzima (JECFA, 2009).

Por otro lado, tiempos de fermentación de masa prolongados de hasta 2 h puede reducir la concentración de acrilamida en el pan por eliminación de asparagina libre (Konings y col., 2007). Sin embargo, también están asociados a un aumento en los niveles de 3-MCPD (Hamlet y Sadd, 2005).

Respecto a los azúcares reductores, se han identificado dos posibles estrategias para reducir los niveles de azúcares en las patatas. Durante el almacenamiento, aumenta la cantidad de azúcar, por tanto, la utilización de patatas frescas supone una reducción en los niveles de acrilamida. Además, temperaturas de almacenamiento por debajo de 10 °C incrementa la formación de los azúcares por la degradación del almidón. Sin embargo, se ha demostrado que por irradiación (60 Gy) del brote de la patata y posterior almacenamiento a 4 y 14 °C, se reduce el contenido en azúcares reductores (11%), y por tanto de acrilamida (8%) (Mulla y col., 2011). Variedades de patata con cantidades relativamente más bajas de azúcares reductores y asparagina también afectarán a los niveles de acrilamida. Asimismo, se recomienda seleccionar una variedad de patata con un contenido inferior a 3 g/kg de azúcares reductores para la elaboración de patatas fritas de aperitivo (CIAA, 2006)

2.8.2. Condiciones/métodos de procesado

El control de los parámetros de procesado, como la temperatura, el tiempo de calentamiento, el tipo de aceite, etc., podría ser considerado como el camino más directo para reducir la acrilamida.

Los resultados encontrados en la bibliografía indican que no existe un simple aumento lineal entre la concentración de acrilamida y la temperatura, pero sí con el tiempo de calentamiento (Mottram y col., 2002). La selección de una adecuada temperatura y tiempos de calentamiento no demasiado largos controlarían la formación de elevadas cantidades de acrilamida. Además, el grado de pardeamiento de la superficie del alimento puede ser utilizado como un indicador visual en la formación de acrilamida (Gökmen y col., 2008). No obstante, la RM también garantiza el aroma y el sabor apetecible, la textura y el color en los alimentos procesados, por lo que una reducción de tiempo y temperatura podrían comprometer esos aspectos tan importantes para el consumidor.

No se ha encontrado unanimidad en los trabajos publicados respecto a si el tipo de aceite empleado afecta a la formación de acrilamida. Por ejemplo, el origen de los aceites vegetales empleados en fritura no parece afectar a los niveles de acrilamida en patatas (Mestdagh y col., 2005). Sin embargo, se han encontrado concentraciones más elevadas de acrilamida cuando se utilizan aceites que contengan silicona o de palma (Gertz, 2002).

En referencia a los métodos de procesado, son pocos los artículos que están dirigidos a la reducción de la temperatura sin causar efectos negativos. Uno de los ejemplos más representativos es la aplicación de técnicas de vacío en el proceso de fritura (Granda y col., 2004). Asimismo, el empleo de microondas como pretratamiento resultó ser muy efectivo en la reducción de acrilamida (hasta un 60%) en papatas fritas (Erdogdu y col., 2007). El cambio en la estructura de la patata, como consecuencia del tratamiento previo de microondas, produce temperaturas más bajas en la superficie y menores tiempos de fritura para lograr el mismo producto final.

2.8.3. Composición

Otra de las estrategias de mitigación de la acrilamida es a través de la composición del alimento: por sustitución de precursores que son altamente reactivos, por otros menos propensos a reaccionar para formar acrilamida, o por adición de ingredientes que inhiban la reacción de formación de acrilamida o favorezcan su eliminación.

- Sustitución de ingredientes

El empleo de sacarosa en lugar de miel o jarabe de azúcar invertido reduce la formación de acrilamida en galletas, panes y pasteles (Amrein y col., 2004b). Este hecho se puede explicar

por la falta de compuestos carbonílicos reactivos, concretamente fructosa y glucosa, lo que lleva a una fuerte disminución en el progreso de la RM. Se ha demostrado que el bicarbonato amónico, utilizado como gasificante en la masa, aumenta en gran medida la formación de acrilamida. La sustitución de este hidrogenocarbonato por su sal correspondiente causa una disminución de hasta un 70% (Graf y col., 2006). También se puede sustituir por una mezcla de diferentes agentes (bicarbonato de sodio y acidulantes, disódico difosfato, bicarbonato potásico y bitartrato de potasio) aunque por lo general conduce a que los productos puedan resultar inaceptables para el consumo, debido a que dejan residuos que pueden crear mal sabor, textura, color y aroma. Por último, la sustitución de bicarbonato amónico por las sales de sodio entra en conflicto directo con los esfuerzos de la OMS para reducir la hipertensión y enfermedades del corazón a través de la reducción de sodio en la dieta. Estos aspectos serán desarrollados posteriormente en el Artículo 1.1 del **Capítulo 1**.

- Adición de ingredientes

Modificador del pH

El pH neutro es el óptimo para la formación de acrilamida en los alimentos. Se ha demostrado que el ácido cítrico es el modificador más eficiente en la reducción de acrilamida en sistemas modelo de patata (78%, pH 3,7), seguido por el láctico (62%, pH 4,2) y el acético (46%, pH 4,5) comparado con el control (pH 5,4) (Mestdagh y col., 2008a). Vinci y col. estudiaron el efecto del ácido cítrico y acético en la producción de patatas fritas a escala industrial observando también mayor reducción en el caso del cítrico (Vinci y col., 2011). Sin embargo, la utilización del ácido acético no es muy recomendable debido a los efectos negativos causados por su volatilidad y por la alteración en el sabor de los alimentos.

Proteínas o aminoácidos

La adición de aminoácidos o ingredientes a base de proteínas en la alimentación, pueden influir en la ruta de reacción de la acrilamida. Por ejemplo, la glicina y la lisina ejercen sus efectos beneficiosos o bien al competir con la asparagina por el grupo carbonilo del azúcar o bien al formar aductos con la propia acrilamida.

Entre los aminoácidos estudiados, la glicina ha resultado ser el más eficaz (Rydberg y col., 2003). En derivados de patata, la reducción oscila desde el 30 al 90%, según la concentración de glicina (0,3 a 1,0% p/p) y las condiciones de procesado utilizadas. Por el contrario, en productos de panadería se ha logrado reducciones alrededor del 15-20% mediante la adición de los aminoácidos a la masa antes de hornear (en este caso, sin embargo, la concentración de

aminoácidos fue de tres a cuatro veces menor que en los estudios anteriores) (Sadd y col., 2008).

De la misma manera la cisteína parece favorecer la eliminación de la acrilamida debido a la reacción de ésta con los grupos SH de la cisteína, formando el cisteinil-S- β -propionamida (Friedman, 2003). Desafortunadamente, su uso está restringido debido a los olores desagradables que puede generar en los alimentos.

En otro estudio llevado a cabo recientemente se mostró que la taurina, un aminoácido semiesencial derivado de la cisteína y la metionina, ejerce su efecto inhibitor mediante la reacción directa con la acrilamida formando aductos acrilamida-aurina (Hao y col., 2011). De la misma manera, las proteínas pueden actuar inhibiendo la reacción de formación o eliminando la acrilamida formada mediante reacción con los grupos NH₂ o SH de las cadenas de los aminoácidos.

Cationes

La influencia de cationes mono o divalentes también se ha estudiado ya que no solo parecen prevenir la formación de la base de Schiff de la asparagina, sino también exhibir efectos catalíticos sobre la reacción de polimerización de la acrilamida (Kolek y col., 2007).

Los estudios sobre el efecto del NaCl en sistemas modelo y alimentos (galletas y pan) han demostrado que, con concentraciones relativamente bajas de Na⁺ (1-2%, p/p) se disminuyen las cantidades de acrilamida, mientras que con niveles más altos, aumentan (Claus y col., 2008; Levine y Smith, 2005). Gökmen y Şenyuva (Gökmen y Şenyuva, 2007) encontraron que la adición de cationes divalentes (Ca²⁺) provoca la completa inhibición de la formación de acrilamida tanto en sistemas modelo como en alimentos, mientras que los cationes monovalentes (Na⁺) reducen las cantidades de acrilamida en un 70%. Asimismo, ha dado buenos resultados la inmersión de patatas en soluciones salinas (Gökmen y Şenyuva, 2007), e incluso mejores si se acompaña previamente de un lavado en agua caliente, ya que este tratamiento favorece la difusión del NaCl (Pedreschi y col., 2010). Estos tratamientos fueron capaces de reducir los niveles de acrilamida sin que se vieran afectadas las propiedades sensoriales del alimento. Sin embargo, pueden producirse efectos negativos, por ejemplo, cuando se añade CaCl₂ (1,2%, p/p) a la masa de galletas y pastas, se reduce la acrilamida aproximadamente en un 60% pero no deja que la masa se eleve adecuadamente (Sadd y col., 2008).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que aunque los cationes son capaces de reducir acrilamida, pueden aumentar también las concentraciones de HMF debido a que previenen la formación de la base de Schiff, y por tanto, cambian la ruta de reacción hacia la deshidratación de la glucosa, la cual conduce a la formación de HMF y furfural (Quarta y Anese, 2010).

Antioxidantes

Los resultados publicados sobre los efectos de los antioxidantes en la formación de acrilamida son contradictorios y no concluyentes.

Se observó un aumento en los valores de acrilamida cuando las patatas fueron empapadas en un 1% p/v de extracto de arándano y de orégano antes de freirlas (Vattem y Shetty, 2003), así como en carne adicionada con BHT, sésamo y vitamina E antes de su cocinado (Tareke, 2003). En otros estudios, se observaron ligeras reducciones cuando se adicionó ácido ascórbico a sistemas modelo de patatas (Biedermann y col., 2002c) o romero al aceite de fritura de patatas (Becalski y col., 2003), mientras que la presencia de especias logró reducciones entre un 50 y un 75% (Ciesarova y col., 2008). Resultados similares se obtuvieron mediante la adición de un 3% de ácido ferúlico a un sistema modelo de galletas (Levine y Smith, 2005).

Se ha demostrado que los antioxidantes pueden ejercer sus efectos beneficiosos debido a que capturan los electrones libres de los radicales intermedios formados en la RM (Friedman y Levin, 2008). En realidad, la eficacia de los antioxidantes parece ser dependiente de la concentración. Rydberg y col. añadieron ascorbato sódico en muestras de patata y observaron que a bajas concentraciones este compuesto produce un ligero aumento en las cantidades de acrilamida, mientras que a concentraciones más altas el contenido disminuye (Rydberg y col., 2003). De forma similar, otros autores mostraron que la adición de antioxidantes (compuestos fenólicos) a partir de hojas de bambú y té verde, en un sistema modelo equimolar de Glu-Asn, reduce la formación de acrilamida dependiendo de la concentración (Zhang y Zhang, 2008).

Pero no solo la concentración juega un papel importante sino también el tipo de compuestos fenólicos. En el **Capítulo 1** de esta Tesis (Artículo 1.3) se estudia este efecto. Los compuestos que contenían un grupo aldehído en su estructura, o no redujeron o aumentaron el contenido de acrilamida (Kotsiou y col., 2010; Zeng y col., 2009). De la misma manera, la adición a aceitunas maduras de extracto de orégano y compuestos antioxidantes naturalmente presentes, como el hidroxitirosol y el 3,4-dihidroxifenil glicol (contienen grupos aldehídos), no redujo el contenido de acrilamida (Casado y col., 2010). Por tanto, este hecho está relacionado

con la estructura de cada uno de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen. En este sentido, los grupos funcionales (hidroxilo o aldehído) terminales de la cadena, desempeñan un papel significativo en la capacidad de los compuestos fenólicos para interrumpir o favorecer ciertas rutas del mecanismo de formación de la acrilamida (Kotsiou y col., 2010; Kotsiou y col., 2011). El mecanismo por el cual se produce la reducción en los valores de acrilamida, puede ser debido a la capacidad de los compuestos fenólicos de atrapar compuestos intermedios de reacción (Kotsiu y col., 2011). A partir de la elucidación estructural se ha comprobado que, efectivamente, la (-)-epigallocatequina-3-galato, el principal polifenol bioactivo del té verde, y la naringenina, un flavonoide de los cítricos, atraparon compuestos dicarbonílicos reactivos (Sang y col, 2007; Cheng y col., 2009).

Vitaminas

Dada la importancia de la vitamina B₆ respecto a la inhibición de la acrilamida en el desarrollo de esta Tesis, se ha considerado oportuno hacer referencia.

Diversos estudios demuestran el papel que tienen las vitaminas en la reducción de acrilamida. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que especialmente la piridoxamina, luego la piridoxina, y en menor medida, el piridoxal (vitámeros de la B₆), son eficaces a la hora de reducir la acrilamida en sistemas modelo (**Capítulo 3. Artículo 3.1**). Al mismo tiempo, otros autores realizaron una investigación en sistemas modelo y patatas confirmando nuestros resultados. Además, también estudiaron el efecto de otras vitaminas como la vitamina A, otras del grupo B, vitaminas C, D, E y K. Los resultados demostraron que las que son solubles en agua fueron mejores inhibidoras de la formación de acrilamida que las que no lo son (Zeng y col., 2009).

En general, la actividad antioxidante se ha propuesto como uno de los mecanismos posibles para explicar la inhibición de la acrilamida por efecto de las vitaminas, sin embargo, hay que tener en cuenta las características estructurales de cada una de ellas. Por ejemplo, algunas vitaminas contienen grupos nucleófilos, como es el caso de la piridoxamina que contiene un grupo amino capaz de reaccionar con la acrilamida (compuesto α,β -insaturado) y formar aductos (Arribas-Lorenzo y col., 2011) (**Capítulo 3, Artículo 3.3**) o bien atrapar compuestos carbonílicos intermedios, interviniendo, por tanto, en el mecanismo de formación (**Capítulo 3, Artículo 3.2**). Otras vitaminas como la niacina (Zeng y col., 2010) y el ácido ascórbico (Adams y col., 2010) también formaron aductos con la acrilamida.

Eliminación de la molécula de acrilamida

Con respecto a las estrategias de mitigación, la eliminación de acrilamida es conceptualmente diferente a las comentadas hasta ahora. De hecho, el objetivo no es reducir la formación de acrilamida durante el procesado de los alimentos, sino eliminar físicamente la molécula después de que el tratamiento térmico se haya completado. Esto puede llevarse a cabo gracias a su bajo peso molecular, y al estudio de sus propiedades físicas y químicas. En principio, la acrilamida puede ser retirada de los alimentos mediante aplicación de vacío con unas condiciones adecuadas de temperatura y presión. Ya en el año 2003, Zhaoyang investigó esta posibilidad física de eliminación mediante la introducción de patatas fritas en un dispositivo al cual se le había aplicado un vacío de 1,33 Pa, durante 1 h a 85 °C (Zhaoyang, 2003). Más tarde experimentos llevados a cabo en sistemas modelo confirmaron dichos resultados (Nicoli y Anese, 2006). Sin embargo, se ha comprobado que no sólo las condiciones de presión, temperatura y tiempo influyen en la cantidad de acrilamida eliminada, sino también la actividad de agua y la composición del alimento (Anese y col., 2010).

2.9. Niveles en alimentos

Desde el descubrimiento de la acrilamida en alimentos cocinados, la comunidad científica ha realizado grandes esfuerzos para recopilar el mayor número de datos a este respecto.

Como ya se ha comentado, existen diferentes bases de datos, de las cuales la del Centro Común de Investigación-Instituto de Materiales y Medidas de Referencia (JRC-IRMM) de la Comisión Europea es la más importante, iniciándose en el año 2003. Más tarde, en 2007, la Comisión Europea emitió una recomendación a los Estados miembros (Recomendación de la Comisión 2007/331/CE) con la finalidad de emprender un seguimiento anual de los niveles de acrilamida para los años 2007, 2008 y 2009 de acuerdo con un procedimiento de muestreo. En el 2009, la EFSA comparó los resultados de la vigilancia de los niveles de acrilamida del año 2007 con los anteriores resultados recogidos en el período 2003-2006 por el JRC-IRMM. Posteriormente, se emitió un informe actualizado respecto del seguimiento de los resultados del 2008 en comparación con los del 2007. Y en abril del 2011 se publicó el informe final del periodo de muestreo de los tres años (EFSA, 2011) donde aproximadamente el 52%, 42% y 40% de los resultados fueron aportados por Alemania en 2007, 2008 y 2009, respectivamente. Un resumen de estos resultados se presenta en la Tabla 15.

Grupo	2007		2008		2009	
	(µg/kg)		(µg/kg)		(µg/kg)	
	Media (Mediana)	Máx.	Media (Mediana)	Máx.	Media (Mediana)	Máx.
Galletas						
<i>Crackers</i>	291-292 (195)	1526	203-206 (185)	1042	195-208 (98)	1320
Infantiles	197-204 (100)	2300	98-110 (64)	1200	88-108 (80)	430
Sin especificar	299-303 (173)	4200	213-223 (126)	1940	128-140 (76)	2640
Barquillos	206-210 (118)	1378	251-254 (109)	2353	244-246 (213)	725
Pan						
Tostado	221-226 (116)	2430	229-231 (107)	1538	219-223 (186)	860
De molde	54-68 (30)	910	31-46 (30)	528	27-37 (27)	364
Sin especificar	172-190 (58)	2565	11-23 (19)	86	54-76 (49)	1460
Cereales de desayuno						
	130-150 (100)	1600	140-156 (75)	2072	132-142 (87)	1435
Cereales infantiles						
	48-69 (38)	353	35-51 (25)	660	55-70 (25)	710
Café						
Instantáneo	357 (188)	1047	499-502 (482)	1373	591-595 (584)	1470
Sin especificar	259-261 (183)	1158	278-286 (210)	734	551 (237)	2929
Tostado	245-251 (197)	958	200-204 (164)	1524	225-231 (193)	2223
Patatas fritas						
	354-357 (246)	2668	281-285 (220)	2466	326-328 (247)	3380
Potitos						
	22-44 (30)	162	16-35 (25)	297	32-47 (25)	677
Otros productos						
Pan de jengibre	423-425 (226)	3615	432-436 (227)	3307	376-384 (132)	4095
Muesli y avena	205-210 (156)	805	20-41 (30)	112	53-82 (50)	484
Sin especificar	232-244 (134)	2529	160-173 (60)	2592	182-204 (100)	1650
Sucedáneo del café	772-775 (334)	4700	988 (702)	7095	1502-1504 (1148)	4300
Patatas de aperitivo						
	574-576 (413)	4180	626-630 (436)	4382	689-693 (394)	4804
Patatas caseras						
Fritas	344-354 (182)	1661	220-228 (152)	1220	234-241 (201)	1238
Sin especificar	266-277 (150)	2175	175-191 (75)	3025	257-265 (104)	2762
Al horno	380-385 (260)	941	275-276 (172)	1439	317 (189)	1665

Tabla 15. Valor medio, mediana y máximo de acrilamida en los diferentes alimentos entre los años 2007-2009 (EFSA, 2011).

Los mayores niveles de acrilamida en los años 2007 y 2008 se encontraron en los sucedáneos del café como la malta o la achicoria en los cuales se llegaron a alcanzar valores de 7100 µg/kg,

mientras que en el año 2009 el valor más alto fue en las patatas fritas de aperitivo (4804 µg/kg). Por el contrario, el pan de molde, los cereales infantiles y los potitos son los que presentaron los niveles de concentración más bajos, no superando los 70 µg/kg en los tres años.

En general, el grupo de las patatas fritas de aperitivo ha sido uno de los más estudiados debido a la importante contribución a la exposición a acrilamida en la población, basada tanto en el alto consumo como en el elevado contenido de acrilamida. Los valores de acrilamida (mediana) no mostraron ningún cambio estadísticamente significativo a lo largo de los tres años a pesar de las medidas adoptadas por las industrias en solicitud de la CIAA con el fin de reducir los niveles (CIAA, 2011). Por otra parte, las patatas fritas de aperitivo presentaron concentraciones de acrilamida más altas que las patatas fritas problemáticas debido a su mayor relación superficie/volumen. En el Artículo 4.1 del **Capítulo 4** se discutirá sobre los valores de acrilamida en las patatas fritas de aperitivo así como su estimación de ingesta en la población española.

Un segundo gran grupo de alimentos que contribuyen a la exposición a acrilamida en adultos y niños son los productos a base de cereales y, en particular el pan de molde y las galletas, a pesar de que presentan niveles que están por debajo de los de las patatas fritas como se observa en la Tabla 15.

Los valores correspondientes al pan de molde fueron muy diferentes en los diversos Estados miembros en los años 2007 a 2009 por lo que la tendencia europea no se pudo determinar. Sin embargo, se observó una tendencia creciente en los valores durante los tres años para el caso del pan tostado, aunque este grupo de alimentos en general contribuye en menor medida a la exposición media de acrilamida. Las únicas tendencias decrecientes en los tres años fueron observados para el caso de los *crackers* (35%), las galletas infantiles (49%), y el pan de jengibre (27%). En la bibliografía, los resultados de las actividades de vigilancia en los Países Bajos han mostrado un descenso similar en los productos tipo pan de jengibre analizados en 2006, probablemente debido a un cambio en el agente gasificante (Konings y col., 2007).

Otro grupo especialmente importante, debido a la elevada exposición a acrilamida por parte de los adultos, es el café. Cabe recordar que las opciones disponibles para reducir los niveles de acrilamida sin afectar a la calidad del producto son muy limitadas (CIAA, 2011). Cuando se compararon los valores medios del año 2009 de los tres tipos de café analizados: tostado,

instantáneo y sucedáneos, con los de los dos años anteriores, se observó que aumentaron los niveles en el caso del café instantáneo, mientras que para los dos grupos restantes la tendencia no se pudo evaluar. Durante el periodo de muestreo, el café tostado presentó concentraciones alrededor de dos veces inferiores con respecto al café instantáneo (Tabla 15). Sin embargo, las concentraciones más elevadas de acrilamida se encontraron para el café de malta o la achicoria (hasta tres veces superior). Afortunadamente, ni los sustitutos del café ni el café instantáneo son los principales contribuyentes a la exposición a acrilamida media global (menos del 2,7%) (EFSA, 2011).

A pesar de que estos grupos de alimentos son los más estudiados debido a su elevado consumo y por tanto a su exposición, también se ha detectado acrilamida en otros productos como por ejemplo en avellanas y almendras tostadas, en aceitunas de mesa y en alimentos que no han sido sometidos a un calentamiento intenso como es el caso de las frutas desecadas (ciruelas, peras, y albaricoques). Por ejemplo, en el caso de las almendras tostadas, éstas contienen precursores de acrilamida en niveles apreciables. Así el contenido de asparagina libre se encuentra comprendido en el rango 2000-3000 mg/kg mientras que los niveles de glucosa y fructosa entre 500-1300 mg/kg y de sacarosa entre 2500-5300 mg/kg (Zhang y col., 2009). Como resultado de ello, las concentraciones de las almendras tostadas oscilan entre 260 a 1530 µg/kg (Becalski y col., 2003). Aunque la concentración en tales productos puede ser muy alta, su contribución en general a la ingesta de acrilamida es marginal. Por último, los alimentos de origen animal tratados térmicamente como la carne y el pescado, por lo general, presentan niveles bajos o no cuantificables de acrilamida (EFSA, 2009).

Por otra parte, la FDA dispone de su propia base de datos (U.S. FDA, 2006) así como la OMS (FAO/WHO, 2005). Los datos analizados desde 2002 hasta 2004 fueron proporcionados por 24 países siendo el número total de los resultados de 6752 (Tabla 16). Si se comparan los resultados obtenidos a través de la OMS con los procedentes de la EFSA, puede observarse que son similares, exceptuando los resultados del pan y las galletas cuyos valores son algo más elevados en el caso de la OMS, y en los cereales de desayuno que ocurre justo al contrario. Esta similitud es totalmente explicable ya que el 67,6% de los resultados de la OMS proviene de Europa, y solo el resto de América del Norte (21,9%), Asia (8,9%) y del Pacífico (1,6%).

Grupo	Media (µg/kg)	Máximo (µg/kg)
Cereales y productos a base de cereales	343	7834
Cereales y pasta, crudos y cocidos	15	47
Cereales y pasta procesada (tostados, fritos, horneados)	123	820
Productos procesados a base de cereales	366	7834
Pan	446	3436
Pasteles y galletas	350	7834
Cereales de desayuno	96	1346
Pizza	33	763
Pescado (incluyendo empanados, fritos, al horno)	25	233
Carne (incluyendo cocida y frita)	19	313
Leche y productos lácteos	6	36
Nueces y semillas oleaginosas	84	1925
Raíces y tubérculos	477	5312
Puré de patata / cocida	16	69
Patata cocinada	169	1270
Patatas fritas de aperitivo	752	4080
Patatas fritas	334	5312
Croquetas (congeladas)	110	750
Excitantes y análogos	509	7300
Café (de máquina)	13	116
Café (molido, instantáneo, o tostado)	288	1291
Extractos de café	1100	4948
Café descafeinado	668	5399
Sustitutos de café	845	7300
Productos de cacao	220	909
Té verde (tostado)	306	660
Azúcar y miel (principalmente chocolate)	24	112
Verduras	17	202
Crudas, cocidas y de lata	4	25
Procesadas (fritas, al horno)	59	202
Fruta, fresca	< 1	10
Frutos secos	131	770
Bebidas alcohólicas (cerveza, ginebra, vino)	6	46
Condimentos y salsas	71	1168
Fórmulas infantiles	< 5	15
En conserva, potitos	22	121
Galletas para bebés	181	1217
Alimentos desecados	121	1184

Tabla 16. Valores medios y máximos de acrilamida en diferentes alimentos (FAO/WHO, 2005).

IV. Parte experimental

Capítulo 1

Estudios sobre la influencia de los constituyentes del alimento y las condiciones de procesado

1.1. Contenido de acrilamida en alimentos españoles: estudio en productos de galletería y panadería. Efecto de la composición del alimento

Los productos de galletería y panadería forman parte de una gran familia de alimentos horneados a base de cereales que pueden tener un origen y una composición muy diversa. Su elaboración requiere diferentes etapas, como la mezcla de los ingredientes, amasado, fermentación de la masa, cocción y, en algunos casos, una etapa final de tostado. Estas últimas etapas favorecen las principales reacciones responsables del color y sabor característicos de estos productos, como son la RM y la caramelización.

Cuando se desarrolló este trabajo experimental, la EFSA y el IRMM estaban recopilando información de base científica entre laboratorios expertos con el fin de realizar una estimación de ingesta de acrilamida a nivel europeo. El objetivo de este trabajo es por tanto, ofrecer una visión de los niveles de acrilamida en galletas y derivados de pan comercializados en España, así como estudiar la influencia de la composición. Debido a que el consumo, tanto de galletas como de derivados de pan, se encuentra bastante extendido, podrían ser una fuente importante de exposición a acrilamida en la dieta española. Este trabajo también estudia la relación entre la estimación de ingesta de este contaminante y los diferentes grupos de población. Los resultados obtenidos han proporcionado un mayor conocimiento de la situación en España, hasta el momento desconocida.

Se analizaron un total de 45 tipos de derivados de pan y 65 muestras diferentes de galletas. La técnica analítica empleada para la determinación de acrilamida en las muestras fue LC-MS, obteniéndose como LOQ un valor de 30 µg/kg para ambos productos. Los contenidos de acrilamida fueron: <LOQ-2085, <LOQ-151, <LOQ-296 y <LOQ-323 µg/kg para las galletas, el pan tostado, los *crackers* y los colines, respectivamente. Se recopiló la información nutricional y composicional de cada una de las muestras analizadas con el objeto de trazar relaciones entre la composición del alimento y los niveles de acrilamida.

Se encontraron niveles significativamente más elevados de acrilamida en las muestras de galletas elaboradas con bicarbonato amónico y con un alto contenido en fibra dietética (> 5%). Mientras que las menores concentraciones se observaron en aquellas muestras enriquecidas con ingredientes funcionales.

Se estimó la ingesta diaria de acrilamida a partir de las galletas y los derivados de pan en la población general, siendo el valor calculado de 0,082 µg/kg/día. Sin embargo, la ingesta varió en función de otros aspectos como los hábitos alimenticios de cada Comunidad Autónoma, el entorno familiar o el nivel socio-económico.

Este trabajo ha sido publicado en la revista *Food Additives and Contaminants* bajo el título ***“Acrylamide content of selected Spanish foods: Survey of biscuits and bread derivatives”***.

Acrylamide content of selected Spanish foods: Survey of biscuits and bread derivatives

JOSE A. RUFIAN-HENARES, GEMA ARRIBAS-LORENZO, & FRANCISCO J. MORALES

Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto del Frio, Jose Antonio Novais 10, Madrid 28040, Spain

(Received 11 September 2006; revised 24 October 2006; accepted 28 October 2006)

Abstract

An overview of the acrylamide content in commercial biscuits and bread derivatives (bread sticks, bread crust, crackers) marketed in Spain is presented. Acrylamide was determined by stable isotope dilution LC–MS with an LOQ of $30 \mu\text{g kg}^{-1}$. Acrylamide content ranged from $<\text{LOQ}$ –2085, $<\text{LOQ}$ –151, $<\text{LOQ}$ –296 and $<\text{LOQ}$ –323 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for biscuits, crisp bread, crackers and bread sticks, respectively. Acrylamide was significantly higher in samples when ammonium hydrogen carbonate had been used as a rising agent and high fibre content ($>5\%$) used in the formulation, but lower when functional ingredients, such as polyols, were used. An estimation of the acrylamide dietary exposure related to biscuits and bread derivatives was calculated as $0.082 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$. Estimated dietary intake were 0.002 and $0.058 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ for crackers and biscuits, respectively.

Keywords: *Acrylamide, biscuits, crisp bread, crackers, bread sticks, food contaminants*

Introduction

The detection of acrylamide, which has been classified as a probable carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC 1994), in a large variety of heated foods (Tareke et al. 2002) has created concern among regulating authorities, the food industry and general public. Consequently, worldwide monitoring of acrylamide in different food types has begun (Lineback et al. 2005). Extensive data on levels of acrylamide have been collected by the European Commission (2005) and by the US Food and Drug Administration (2004). Among the most important matrices included in the European monitoring database are potato chips, crispbread, breakfast cereals and biscuits.

Acrylamide is formed in the Maillard reaction—reducing sugars, such as glucose and fructose, and the amino acid, asparagine, being the major reactants (Stadler et al. 2002, 2004; Zyzak et al. 2003). Two mechanisms, varying in details, have been proposed (Becalski et al. 2003; Zyzak et al. 2003). However, evidence clearly points to the reaction between asparagine and reducing sugars as the main source.

It is now well-established that processing conditions, such as time, temperature and matrix, influence acrylamide formation and degradation (Friedman 2003). Acrylamide formation was found to occur during the browning process at temperatures above 120°C (Mottram et al. 2002; Yaylayan et al. 2003). In the case of starchy products (mainly bakery), acrylamide contents up to $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$ were observed (Croft et al. 2004). The highest contents were often found in products, such as gingerbread, prepared with the baking agent, ammonium hydrogen carbonate (Konings et al. 2003; Amrein et al. 2004), which has been shown to strongly promote acrylamide formation in sweets bakery (Biedermann et al. 2003; Graf et al. 2006).

As stated above, investigations on acrylamide formation has focused on food commodities with high acrylamide levels, such as potato-derived foodstuffs, or those having a significant impact on population dietary habits, such as cereal-based foodstuffs. Biscuits and bread derivatives comprise a huge family of products obtained by baking a variety of cereal crops. Generally, manufacture of both types of products involves different steps, such as mixing of ingredients and kneading, dough

fermentation (mainly in bread crust and bread sticks), baking to 250°C for 15–30 min and, in some cases, a final toasting step (Ramirez-Jimenez et al. 2000). This last step favours the main chemical reactions involved during biscuits or bread derivatives manufacture, the Maillard reaction and caramelisation, which are responsible for the colour and flavour of these products (Ramirez-Jimenez et al. 2000).

This study gives an overview of acrylamide levels in commercial biscuits and bread derivatives marketed in Spain. These products, due to their relatively widespread consumption, could be a key source of acrylamide in the Spanish diet. Therefore, the relationship between acrylamide intake and population factors is also presented. In addition, the correlation among levels of acrylamide and compositional parameters of the samples (i.e. presence of ammonium hydrogen carbonate, dietary fibre content and biscuit speciality) was investigated.

Materials and methods

Samples

Experiments were conducted with a series of commercial biscuits (62 samples), bread crust (24 samples), bread sticks (10 samples) and crackers (11 samples) randomly purchased in different supermarkets from the Autonomous Community of Madrid (Spain). The distribution of samples was representative of the proportions of these food commodities in the Spanish market. Samples (300–500 g) were mixed and finely ground to ensure homogeneous distribution. Sub-samples (20 g) were divided into four containers and stored under vacuum and light-protected at 4°C until analysis.

Chemicals and materials

[¹³C₃]acrylamide (isotopic purity 99%) was from Cambridge Isotope Labs (Andover, MA, USA). Acrylamide (99%), potassium ferrocyanide (Carrez I), zinc acetate (Carrez II) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetic acid (ultrapure grade) and Pronase E were from Merck (Darmstadt, Germany). Methanol and acetonitrile (HPLC grade) were from Scharlau (Barcelona, Spain). The solid-phase extraction (SPE) cartridges Isolute® Multimode (500 mg, 3 ml) were from IST (Hewgoed, Mid-Glamorgan, UK).

Acrylamide standard and reagents

Stock solutions of acrylamide (0.01 mg ml⁻¹) and [¹³C₃]acrylamide (5 µg ml⁻¹) were prepared by

dissolving the compounds in Milli-Q water and methanol, respectively. These solutions were then appropriately diluted with Milli-Q water (Millipore Corp., Madrid, Spain) to prepare working standards at 1.0 µg ml⁻¹. All stock solutions and working standards were stored light-protected in a refrigerator at 4°C for up to 3 months. Carrez I solution was prepared by dissolving 15 g of potassium ferrocyanide in 100 ml of water and Carrez II solution by dissolving 30 g of zinc acetate in 100 ml of water.

Acrylamide analysis

Acrylamide was analysed as described by Rufian-Henares et al. (2006) with some minor modifications.

Sample extraction. Sample powder (0.75 g) was weighed with a precision of 0.1 mg and suspended with 8 ml of Milli-Q water in polypropylene centrifuge tubes. Mixture was spiked with 200 µl of a 5 µg ml⁻¹ [¹³C₃]acrylamide methanolic solution as internal standard and later homogenized. Acrylamide extraction was performed at room temperature for 20 min, and a 10-s shaking every 10 min. To clarify the solution, 0.5 ml of each Carrez I and Carrez II solutions were added and finally the mixture was centrifuged (9000 g; 10 min; 4°C).

Sample clean up. Isolute® Multimode SPE cartridges were preconditioned with 2 ml methanol, 2 ml water and 2 ml air to remove excessive water. An aliquot of the clear supernatant (1 ml) was loaded onto the cartridge at a flow rate of 2 ml min⁻¹. Then, 2 ml of air were passed and, finally, acrylamide was eluted with 1 ml of water at the same flow rate. The solution was filtered through a 0.45 µm filter into an amberlite LC-MS vial.

LC-MS analysis. Sample extracts and calibration standards were analysed on an Agilent 1100 liquid chromatograph coupled to an Agilent Quadrupole MS detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Analytical separation was achieved with a Luna ODS2 (25 × 0.46 cm, 5 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) at 32°C. Isocratic elution was achieved with a mobile phase of acetic acid/methanol/Milli-Q water (0.1:2.5:97.4, v/v) at a flow rate of 0.8 ml min⁻¹. The injection volume was 80 µl. Electrospray ionization in the positive ionization mode was used. The MS detector operated in selected ion monitoring (SIM) mode at *m/z* ratios of 72.1 and 75.1 for acrylamide and [¹³C₃]acrylamide, respectively. Under these chromatographic conditions, acrylamide eluted at 6.8 min. A delay time of 3 min was selected to avoid

Table I. Statistical treatment for acrylamide levels in commercial biscuits grouped according to speciality, presence of ammonium hydrogencarbonate as sole raising agent and dietary fibre content.

Factor	Acrylamide ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	No. of samples
<i>Total</i>		
Mean	423 ± 65.6	62
Median	268	
Minimum	15	
Maximum	2085	
<i>Biscuit speciality</i>		
Breakfast	247 ± 41.8^a	21
Enriched	83 ± 37.4^b	15
Fibre added	284 ± 39.9^a	18
<i>Ammonium hydrogencarbonate</i>		
Yes	1549 ± 117^a	8
No	230 ± 36.2^b	54
<i>Dietary fibre content</i>		
>5%	283 ± 38.1^a	18
<5%	166 ± 31.0^b	44

Different superscript letters within the same factor indicate statistical differences (one-way ANOVA and Duncan's test, $P < 0.05$).

the introduction of coextracted matrix components into the MS instrument prior to acrylamide elution. The needle and cone voltages were set at 3.0 kV and 100 V, respectively. Nitrogen was used as nebulizer gas (12.0 l h^{-1}) and the source temperature was set at 300°C .

Quantitation. Acrylamide was quantified using a linear calibration function that was established with standard solutions of acrylamide and [$^{13}\text{C}_3$]acrylamide dissolved in Milli-Q water ($25\text{--}1000 \mu\text{g l}^{-1}$). Acrylamide contents in sample extracts were calculated from the calibration slope and intercept value, taking into account the recovery calculated by means of [$^{13}\text{C}_3$]acrylamide slope. Limit of quantification (LOQ) was $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ on the basis of signal-to-noise ratio of 3:1.

Statistical. Statistical significance of data was tested by one-way analysis of the variance (ANOVA) (Table I), followed by Duncan's test to compare means that showed significant variation ($P < 0.05$). Analyses were performed using Statgraphics Plus, version 5.1 (2001). At least two independent analyses were carried out per sample.

Results and discussion

Sample analysis

The analysis of acrylamide was carried out by means of an analytical methodology previously established for potato chips (Rufian-Henares and Morales 2006)

and subsequently adjusted for breakfast cereals (Rufian-Henares et al. 2006). The procedure was accurate, precise and had adequate sensitivity to detect the acrylamide content of the targeted food commodities

Bread derivatives. A total of 45 bread types were studied: 24 crispbreads, 10 bread sticks and 11 crackers. A detailed study of acrylamide distribution was carried out and a box-and-whisker plot was used since this graphical presentation uses a non-parametric test (Figure 1a). Acrylamide ranged from $<\text{LOQ}$ – $151 \mu\text{g kg}^{-1}$ for crispbread, with a mean value of $87 \mu\text{g kg}^{-1}$ and a median of $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. In the case of crackers, acrylamide ranged from $<\text{LOQ}$ – $296 \mu\text{g kg}^{-1}$, being mean value $140 \mu\text{g kg}^{-1}$ and median $155 \mu\text{g kg}^{-1}$. Finally, in the case of bread sticks acrylamide ranged from $<\text{LOQ}$ – $323 \mu\text{g kg}^{-1}$ with a mean value of $157 \mu\text{g kg}^{-1}$ and a median of $139 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Similar values were reported by other authors (Murkovic 2004; Senyuva and Gökmen 2006; Yusa et al. 2006), who found acrylamide levels from $11\text{--}210 \mu\text{g kg}^{-1}$ for crisp bread and, in the case of crackers values ranging from $<30\text{--}582 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Riediker and Stadler 2003; Senyuva and Gökmen 2005). The statistical treatment showed that the acrylamide levels of crisp bread are significantly lower ($P < 0.05$) than that of bread sticks and crackers. The composition of both crispbread and bread sticks is similar (mainly wheat flour, baking powder, salt and water), whereas in the case of crackers sodium hydrogencarbonate is used instead of baking powder. Taking into account these similarities, the differences in the acrylamide content could come from the different baking conditions (time and temperature) applied to the products.

Many studies have attempted to find strategies to minimize the levels of acrylamide. This objective can be achieved either by modifying processing parameters, such as pH, temperature/time of heating or acting on precursors or key intermediates. WHO and the Scientific Committee for Food of the European Union called for strategies to reduce acrylamide formation to a minimum by implementing the ALARA principle (as low as reasonably achievable). In this sense the German Federal Office of Consumer Protection and Food Safety (BVL 2004) stated a signal value of $560 \mu\text{g kg}^{-1}$ for bread derivatives, as a concept of minimisation. Signal value is defined as lowest level of the 10% containing the highest level of acrylamide. Then, if acrylamide contents are above this signal value, the food producers are aware to take adequate actions to lower the contents. As stated in Figure 2a,

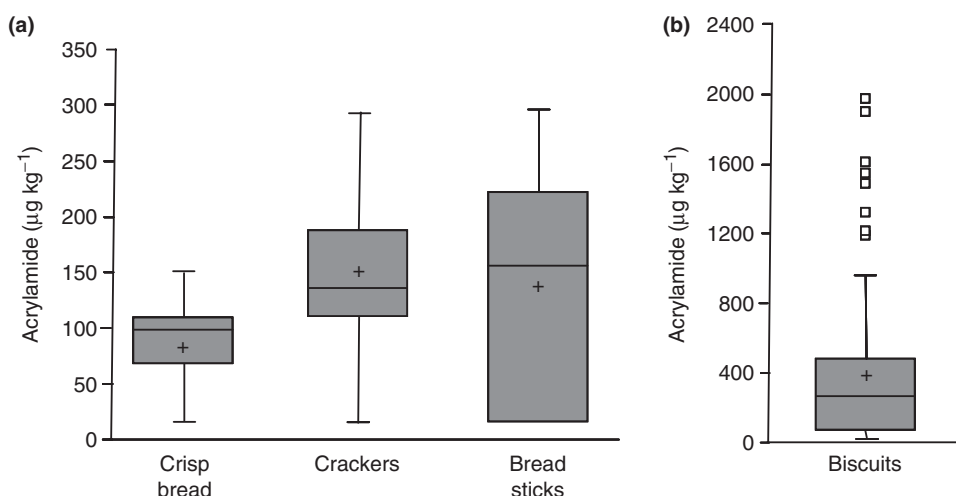


Figure 1. Box-and-whisker plot of acrylamide content in commercial bread derivatives (a) and biscuits (b).

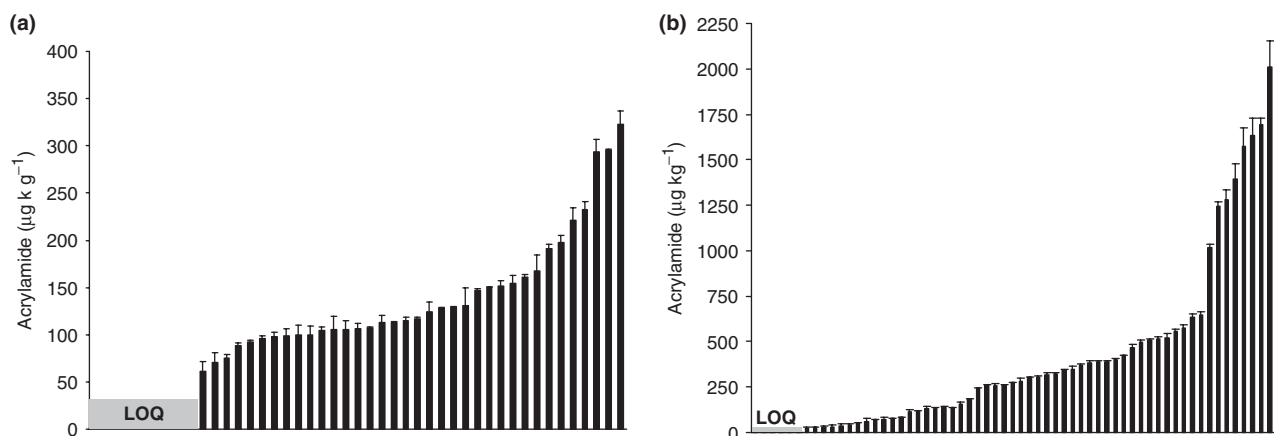


Figure 2. Bar graph of acrylamide content in commercial bread derivatives (a) and biscuits (b).

acrylamide values ranged from $<\text{LOQ}$ – $323 \mu\text{g kg}^{-1}$ for bread derivatives. Then, if the same concept is applied in our survey, none of the samples levels were higher than $560 \mu\text{g kg}^{-1}$. In this sense, due to the lower values of the bread derivatives marketed in Spain, a signal value of $222 \mu\text{g kg}^{-1}$ was established for the whole group. However, if the samples are divided into the three original groups, the obtained signal values for crisp bread, bread sticks and crackers are 129 , 293 and $232 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. This is an important issue taking into account that the California Environmental Protection Agency (Office of Environmental Health Hazard Assessment) has recently proposed an alternative cancer risk level, calculated to result in one excess case of cancer in an exposed population of 10 000 and assuming lifetime exposure, when consuming bread and cereals with an acrylamide concentration lower than $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ (OEHHA 2005).

Biscuits. A total of 62 samples from 15 different producers were studied. In the case of biscuits, the acrylamide content ranged from $<\text{LOQ}$ – $2085 \mu\text{g kg}^{-1}$, with an average value of $423 \mu\text{g kg}^{-1}$ and a median of $268 \mu\text{g kg}^{-1}$. In addition, as shown in the box-and-whisker plot (Figure 1b), eight outliers were found, all of them with acrylamide contents higher than $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$. Similar values have been reported by other authors (Murkovic 2004; Senyuva and Gökmen 2006; Yusa et al. 2006), who found acrylamide levels up to $1060 \mu\text{g kg}^{-1}$. When the statistical treatment was applied to the biscuits and bread derivatives groups, it was found that biscuits present a statistically significant ($P < 0.05$) higher acrylamide content. Contrary to the group of bread derivatives, the composition of biscuits is quite different and complex because different ingredients, such as reducing sugars, are usually added (glucose

and fructose mainly added as corn syrups), fats (including ω_3 -PUFAs), technological agents (ammonium and sodium hydrogencarbonate), etc. It is well-established that one of the components that promote the generation of acrylamide are reducing sugars (Friedman 2003; Zyzak et al. 2003; Stadler et al. 2004). In addition, it has been shown that the baking agent ammonium hydrogen carbonate strongly promotes acrylamide formation (Biedermann et al. 2003; Konings et al. 2003; Amrein et al. 2004; Graf et al. 2006). Then, owing to the presence of a higher content of acrylamide precursors in biscuits, their higher acrylamide content is a logical consequence.

As described previously, biscuits comprise a heterogeneous food commodities group because they are composed of a great variety of ingredients. Then, to ascertain the possible differences in the acrylamide content, biscuits were grouped according to biscuit speciality, presence of ammonium hydrogen carbonate and dietary fibre content. The results of the statistical treatment are depicted in Table I. At the beginning, the first analysis showed no statistical differences (data not shown), but a wide distribution was found among groups of outliers in Figure 2b. Then, due to their high acrylamide content, the mean values of the different groups was slanted. According to the table of composition – supplied by the manufacturers – it was found that the outliers were just addressed to samples with ammonium hydrogencarbonate as the sole raising agent, in contrast with the other 54 samples where different proportions of sodium and ammonium hydrogencarbonate were used. In this sense, it is believed that a higher amount of ammonium hydrogencarbonate was used by the manufacture of the outliers and, because this raising agent enhances the acrylamide generation (Biedermann et al. 2003; Konings et al. 2003; Amrein et al. 2004; Graf et al. 2006), a larger amount of acrylamide was formed. This hypothesis explains the statistically significant differences ($P < 0.05$) between the group where ammonium hydrogen carbonate is the unique raising agent and those with other agents added (mean acrylamide content of 1549 and 230.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively).

Taking into account the explanation given above, the outliers were removed for the rest of the statistical treatment. Biscuits were classified into three groups based on health orientation, which is closely related to their composition: those mainly used for breakfast ($n = 29$), those enriched with functional ingredients ($n = 15$), such as conjugated linoleic acid, ω_3 -PUFA, polyols, soy extracts or L-carnitine, and those fibre-enriched ($n = 18$). Enriched biscuits showed significantly ($P < 0.05$) lower values of acrylamide (83 vs. 247 and

284 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for breakfast and fibre enriched biscuits, respectively). It was found that most of the enriched biscuits had polyols (such as maltitol or lactitol) and potato starch replacing the addition of glucose and/or fructose. This replacement gives rise to a decrease in reducing sugar content and, thus, it is unfavourable to the generation of acrylamide. Moreover, the enriched biscuits are elaborated by adding other kinds of flours, such as rice or malt. In the case of breakfast cereals, it has been shown that there is a higher potential for acrylamide formation in wheat-based cereals followed by corn, oat and rice (CIAA 2005; Rufian-Henares et al. 2006), therefore, it is plausible that the decrease in wheat flour content reduced acrylamide generation in biscuits.

Biscuits usually have dietary fibre contents of 3–4%, but when enriched with wheat-bran and/or whole wheat flour, dietary fibre increases to 10–30%. As illustrated in Table I, there were statistically significant differences in acrylamide content between the dietary fibre-added biscuits ($283 \pm 38.1 \mu\text{g kg}^{-1}$; $n = 18$; fibre content $> 5\%$) and those without dietary fibre ($166 \pm 31.0 \mu\text{g kg}^{-1}$; $n = 44$; fibre content $< 5\%$), results which are in accordance to those previously reported for breakfast cereals (Rufian-Henares et al. 2006). Similar behaviour was reported by Senyuva and Gökmen (2006), who found that the acrylamide content of biscuits with dietary fibre was higher than that of the usual biscuits (486 and 261 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively). This could be explained by the fact that asparagine, the main precursor of acrylamide in cereal products (RHM Technologies 2005) is concentrated in the bran, particularly in wheat-bran (CIAA 2005).

Finally, the relationship was studied between the acrylamide content of biscuits and the signal value stated by the German Federal Office of Consumer Protection and Food Safety (BVL 2004). This organization stated a signal value of 575 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for an adult population and 360 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for children. As depicted in Figure 2b, when applying the same concept, most of the samples (80%) are under the 575 $\mu\text{g kg}^{-1}$ level. Taking into account the results in this survey, a signal level of 1283 $\mu\text{g kg}^{-1}$ is found, although if the eight outliers are omitted (due to the explanation given above concerning to the addition of ammonium hydrogen carbonate), a corrected level of 519 $\mu\text{g kg}^{-1}$ is obtained, quite similar to the German Office figure.

Acrylamide intake mediated by biscuits and bread derivatives

Estimating consumer dietetic exposure to acrylamide is a high priority for governments and industry alike. Extensive research is underway to determine

Table II. Contribution of commercial bread derivatives and biscuits to acrylamide intake^a of the Spanish population.

Factor	Interval	Example	Food			
			Crisp bread	Crackers	Bread sticks	Biscuits
Total population			0.0190	0.0020	0.0030	0.0580
Autonomic community	Maximum	Extremadura for bread derivatives and Balear Islands for biscuits	0.0200	0.0030	0.0040	0.0670
	Minimum	Canary Islands for bread derivatives and Andalusia for biscuits	0.0110	0.0017	0.0020	0.0410
Family components	Maximum	Independent adults for biscuits and couples without children for bread	0.0230	0.0034	0.0042	0.0801
	Minimum	Young couples with children	0.0100	0.0018	0.0018	0.0418
Socio-economic status	Maximum	Upper-class for biscuits and middle/lower-class for bread derivatives	0.0235	0.0027	0.0042	0.0621
	Minimum	Upper-class for bread derivatives and lower-class for biscuits	0.0116	0.0016	0.0024	0.0481
Population size	Maximum	>2000 Inhabitants for bread derivatives and 10 000–100 000 for biscuits	0.0217	0.0027	0.0039	0.0630
	Minimum	<500 000 inhabitants	0.0131	0.0020	0.0024	0.0480

^a Results expressed as $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ taking into account a mean body weight of 70 kg.

the extent to which acrylamide found in food is bioavailable and to identify methods to reduce levels and, thereby, decrease consumer exposure. Consumer-exposure assessments will need to be conducted to gauge the utility of various control options. It is particularly important to be able to assess the impact of proposed changes to the food supply, including the impact of modifications in processing and cooking procedures, on consumer exposures.

To estimate the dietary exposure of Spanish consumers to acrylamide from biscuits and bread derivatives, the intake of these food supplies was used (MAPA 2005). The results, collected in Table II, have been expressed as $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ taking into account a mean body weight of 70 kg. For total population, the intake of acrylamide ranged from 0.002 to 0.058 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ for crackers and biscuits, respectively. In the case of biscuits, their contribution to the total daily intake of acrylamide is intermediate to that of breakfast cereals (0.038 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) and potato chips (0.093 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) previously reported (Rufian-Henares and Morales 2006; Rufian-Henares et al. 2006).

There are considerable differences, even between many European countries, due to differences in food consumption patterns and cooking traditions. Irrespective of cultural differences in nutritional habits, the overall daily intake is about 0.4 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$, according to the most recent FDA estimates, basically confirming earlier estimates from the US and several European authorities (Dybing et al. 2005). Assuming a mean Spanish intake of acrylamide similar to that of other

European countries, a mean daily intake of acrylamide of 0.2 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ can be calculated assuming only the intake of the above reported foods (bread derivatives, biscuits, breakfast cereals, potato chips). Estimations by WHO of the average intake of acrylamide for the general population ranged between 0.3 and 0.8 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$. It was supposed that children and adolescents would generally have exposures up to two to three times more than those of adult consumers when expressed on a body weight basis (WHO 2002).

The foods that contribute most to acrylamide exposure vary depending upon the population's eating habits and the way the foods are processed and prepared. Generally, the most important categories of food appear to be: fried potato products, such as French fries and chips, ready-to-eat breakfast cereals, baked goods, such as cookies, pies and cakes, brewed coffee and breads, according to the most recent results of the FDA/CFSAN (Dybing et al. 2005). In this survey, representative of the Spanish market contribution of biscuits, crisp bread, crackers and bread sticks will be of 14.5, 4.75, 0.5 and 0.75%, respectively, of the estimated dietary intake of acrylamide. In addition, the contribution of potato chips and breakfast cereals will be 23 and 9.5%, respectively (Rufian-Henares and Morales 2006; Rufian-Henares et al. 2006).

In consumer-exposure assessments, it is also important to know whether there are significant differences in exposures in different sub-groups of the population. Thus, the exposure to acrylamide related to those foodstuffs studied was analysed in more detail taking into account socio-economic

aspects (MAPA 2005). It was observed that there are great differences in the intake of bread derivatives depending on the socio-economic community studied, almost doubling their intake. When the number of family members was analysed, it could be stated that the higher intakes was in families composed of one or two independent adults, whereas the lower intakes were found in young couples with children. In the higher cases, the contribution of biscuits changed from 14.5 to 20% of the overall acrylamide intake. In the case of the socio-economic status, the exposure to acrylamide is higher in the upper-class due to their higher biscuit intake. On the other hand, the lower-class showed higher bread derivatives intake, whereas biscuit consumption decreased. Finally, taking into account population size, it was found that the lower acrylamide intake was recorded in cities with more than 500 000 inhabitants, whereas the maximum intake was in localities with low to intermediate number of inhabitants.

Conclusions

This work describes the determination of acrylamide levels in biscuits and bread derivatives cereals marketed in Spain, as a previous survey of foodstuffs had indicated these to contain acrylamide. The data were used to determine the dietary intake of acrylamide for the Spanish population for risk-assessment purposes. A mean daily dietary intake of acrylamide of $0.082 \mu\text{g kg}^{-1} \text{day}^{-1}$ is estimated, for which the contribution of biscuits was higher than that of bread derivatives. It was also shown that, in the case of biscuits, higher acrylamide content was found in those manufactured with ammonium hydrogen carbonate as the only raising agent and in those biscuits with higher proportions of dietary fibre. Conversely, lower acrylamide content was found in biscuits enriched with functional ingredients, such as polyols.

Acknowledgements

We are grateful to D. Gonez and M.A. Martinez-Bartolome for technical assistance. Consejería de Educación y Ciencia (Comunidad Autónoma de Madrid) is thanked for supporting a predoctoral grant for G. Arribas-Arias. This research was supported by the Commission of the European Communities under project COLL-CT-2005-516415. It does not necessarily reflect its views and in no way anticipates the commission's future policy in this area.

References

- Amrein TM, Schönbachler B, Escher F, Amado R. 2004. Acrylamide in gingerbread: Critical factors for formation and possible ways for reduction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:4282–4288.
- Becalski A, Lau BP, Lewis D, Seaman SW. 2003. Acrylamide in foods: Occurrence, sources, and modelling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:802–808.
- Biedermann M, Grob K. 2003. Model studies on acrylamide formation in potato, wheat flour and corn starch; ways to reduce acrylamide contents in bakery ware. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 94:406–422.
- BVL 2004. German Federal Office of Consumer Protection and Food Safety. Available: http://www.bvl.bund.de/cln_027/nn_521172/EN/01_Food/04_Acrylamid_en/05_Signalwerte_en/signalwerte_node.html_nnn=true. Accessed: 2005 June.
- CIAA 2005. Confederation of the Food and Drink Industries of the UE. The CIAA acrylamide “toolbox”, rev. 6, September. Brussels: CIAA.
- Croft M, Tong P, Fuentes D, Hambridge T. 2004. Australian survey of acrylamide in carbohydrate-based foods. *Food Additives and Contaminants* 21:721–736.
- Dybing E, Farmer PB, Andersen M, Fennell TR, Lalljie SPD, Müller DJG, Olin S, Petersen BJ, Schlatter J, Scholz G, et al. 2005. Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food and Chemical Toxicology* 43:365–410.
- European Commission 2005. Directorate General Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements. Available: <http://www.irmm.jrc.be/html/activities/Acrylamide/database.html>. Accessed 2005 February 12.
- Food and Drug Administration (FDA) 2004. Available: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acrydata.html%20via>. Accessed 2004 April.
- Friedman M. 2003. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:4504–4526.
- Graf M, Amrein TM, Graf S, Szalay R, Escher F, Amado R. 2006. Reducing the acrylamide content of a semi-finished biscuit on industrial scale. *LWT Food Science and Technology* 39:724–728.
- IARC 1994. Some industrial chemicals. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon: IARC. Vol 60.
- Konings EJM, Baars AJ, van Klaveren JD, Spanjer MC, Rensen PM, Hiemstra M, van Kooij JA, Peters PWJ. 2003. Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risk. *Food and Chemical Toxicology* 41:1569–1579.
- Lineback D, Wenzl T, Ostermann OP, De La Calle B, Anklam E. 2005. Overview of acrylamide monitoring database. *Journal of AOAC International* 88:246–252.
- MAPA 2005. La alimentación en España. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. 2002. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 419:448–449.
- Murkovic M. 2004. Acrylamide in Austrian foods. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 61:161–167.
- OEHA 2005. California Environmental Protection Agency, Office of Environmental Health Hazard Assessment. Available: www.oehha.org/prop65/law/pdf.zip/Notice-%2012705eAltRiskrevised.pdf. Accessed 2005 June.
- Ramírez-Jiménez A, García-Villanova B, Guerra-Hernández E. 2000. Hydroxymethylfurfural and methylfurfural content of selected bakery products. *Food Research International* 33:833–838.

- RHM Technologies 2005. Presentation at the FSA process contaminants meeting. April, London, UK.
- Riediker S, Stadler RH. 2003. Analysis of acrylamide in food by isotope-dilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1020:121–130.
- Rufian-Henares JA, Morales FJ. 2006. Determination of acrylamide in potato chips by a reversed-phase LC–MS method based on a stable isotope dilution assay. *Food Chemistry* 97: 555–562.
- Rufian-Henares JA, Delgado-Andrade C, Morales FJ. 2006. Relationship between acrylamide and thermal-processing indexes in commercial breakfast cereals: A survey of Spanish breakfast cereals. *Molecular Nutrition and Food Research* 50:756–762.
- Senyuva HZ, Gökmen V. 2005. Survey of acrylamide in Turkish foods by an in-house validated LC–MS method. *Food Additives and Contaminants* 22:204–209.
- Senyuva HZ, Gökmen V. 2006. Interference-free determination of acrylamide in potato and cereal-based foods by a laboratory validated liquid chromatography–mass spectrometry method. *Food Chemistry* 97:539–545.
- Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert MC, Riediker S. 2002. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 419:449–450.
- Stadler RH, Robert F, Riediker S, Varga N, Davidek T, Devaud S, Goldmann T, Hau J, Blank I. 2004. In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:5550–5558.
- Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:4998–5006.
- WHO 2002. FAO/WHO Consultation of the health implications of acrylamide in food. Summary report of a meeting held in Geneva, 25–27 June 2002. Available: <http://www.who.int/fsf/Acrylamide>. Accessed 2005 June.
- Yaylayan VA, Wnrowski A, Perez LC. 2003. Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:1735–1757.
- Yusa V, Quinta G, Pardo O, Marti P, Pastor A. 2006. Determination of acrylamide in foods by pressurized fluid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry used for a survey of Spanish cereal-based foods. *Food Additives and Contaminants* 23:237–244.
- Zyzak DV, Sanders RA, Stojanovic M, Tallmadge DH, Eberhart BL, Ewald DK, Gruber DC, Morsch TR, Strothers MA, Rizzi GP, Villagran MD. 2003. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:4782–4787.

1.2. Influencia del proceso de fritura en la formación de acrilamida e hidroximetilfurfural en masas fritas

Los churros son un alimento de consumo en el desayuno y en la merienda, extendido tanto en España como en muchas regiones de Latinoamérica, aunque recientemente han experimentado un auge en China. Consisten en una masa compuesta principalmente por harina, agua y sal aunque en determinadas regiones de Latinoamérica se puede adicionar azúcar. La masa se fríe a temperaturas comprendidas entre 185 y 200 °C durante 3-4 minutos, siendo por tanto susceptible al desarrollo de la RM.

Este hecho, junto a la recomendación del Comité FAO/OMS de investigar la contribución a la ingesta de contaminantes químicos de procesado en alimentos específicos de determinados hábitos alimenticios de grupos poblacionales, ha conducido a nuestro grupo de investigación a realizar este trabajo con objeto de evaluar el efecto de las condiciones de fritura sobre el contenido de acrilamida e HMF en churros.

Se diseñó un estudio cinético a diferentes temperaturas y tiempos de fritura, empleando churros congelados para asegurar la uniformidad de la masa y un proceso de fritura similar al doméstico. La separación cromatográfica del HMF se llevó a cabo por HPLC-UV empleando una columna C₁₈ de fase inversa en condiciones isocráticas utilizando agua:acetonitrilo (95:5, v/v). El LOQ fue de 0,1 mg/kg. Para el caso de la acrilamida, los procesos de extracción y detección fueron similares a los del artículo anterior. El LOQ fue calculado en 18 µg/kg.

Los valores de HMF encontrados en los churros preparados a escala de laboratorio variaron entre $1,20 \pm 0,02$ y $221,4 \pm 2,0$ mg/kg y los de acrilamida entre $< \text{LOQ}$ y $90 \pm 0,60$ µg/kg en el rango temperatura-tiempo estudiado. En el estudio cinético, los niveles de HMF y acrilamida fueron aumentando con el tiempo y la temperatura. Se observó un periodo de inducción previo a la formación de estos compuestos que variaba en función de la temperatura de fritura. La humedad del producto se redujo a medida que fue aumentando el tiempo de calentamiento, independientemente de la temperatura. Al contrario de lo que ocurre con el contenido de humedad, la temperatura tiene un efecto más determinante que la duración del proceso de fritura en el desarrollo del color en el producto. Se observa un descenso en la luminosidad a medida que la temperatura aumenta. El pardeamiento del producto es

atribuible a la formación de pigmentos coloreados en la superficie del alimento durante las etapas avanzadas y finales de la RM.

Paralelamente, se analizaron los niveles de acrilamida e HMF, en 10 muestras comerciales adquiridas en diferentes churrerías de la Comunidad de Madrid, y se obtuvieron promedios de $46 \pm 24 \mu\text{g/kg}$ y $74,3 \pm 47 \text{ mg/kg}$, respectivamente, con una amplia variabilidad entre las muestras.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la determinación del punto final del proceso de fritura en los churros es crítica para reducir al mínimo la formación de estos contaminantes. Además, el estudio nos ayuda a disponer de un conocimiento previo respecto a la cinética de formación de acrilamida e HMF en masas fritas, y con ello de las posibles alternativas de mitigación.

Este trabajo ha sido publicado en la revista *Food Chemistry* bajo el título ***“The formation of potentially harmful compounds in churros, a Spanish fried-dough pastry, as influenced by deep frying conditions”***. Asimismo, se ha presentado en el congreso *COST-927 Thermally processed foods: possible health implication* (Ebersberg, Germany, 2007) como comunicación oral.

Es oportuno resaltar la posibilidad de transferencia de este conocimiento a una empresa líder mundial en maquinaria automatizada de procesos de fritura ya que desde enero de 2012 dicha empresa está evaluando su implantación.

The formation of potentially harmful compounds in *churros*, a Spanish fried-dough pastry, as influenced by deep frying conditions

F.J. Morales*, G. Arribas-Lorenzo

Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto del Frío, José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain

Received 9 August 2007; received in revised form 19 November 2007; accepted 18 December 2007

Abstract

Colour, moisture, hydroxymethylfurfural (HMF) and acrylamide (AA) were investigated in traditional Spanish *churros*. Samples were deep-fried in sunflower oil at lab-scale temperatures of 180, 190 and 200 °C and for frying times of 2, 3, 5 and 7 min. Fresh made *churros* were also obtained from local producers. HMF ranged from 1.2 ± 0.02 to 221.4 ± 2.02 mg/kg for lab-scale experiments and an average of 74.3 ± 47.5 mg/kg was recorded in commercial samples. AA ranged from below the limit of quantitation to 90 ± 0.6 µg/kg for lab-scale experiments and an average of 46 ± 24.5 µg/kg was measured in commercial samples. Temperatures between 185 and 200 °C are commonly used to obtain *churros* with an acceptable palatability and a crispy surface. However, HMF and AA levels increased nearly two-fold from 190 to 200 °C at the same frying times, indicating that a more precise control of frying temperatures is required to minimize their formation.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Maillard reaction; Fried dough; Hydroxymethylfurfural; Acrylamide; Colour; *Churro*

1. Introduction

Churro is described as a deep-fried dough pastry which is very popular in Spain for breakfasts and snacks. The dough is prepared with wheat flour, water and salt, extruded and deep-fried as strips using sunflower oil as frying oil. Frying temperatures between 185 and 200 °C and frying times of 3–4 min are usually applied to obtain a crispy product. But the end point of this process, when fried-dough portions are removed manually from the fryers is not automatised. Generally, colour and crust formation are used as end point markers of the process but there is no specific information in any literature which discusses this fact.

The Maillard reaction (MR) is a complex chain of chemical reactions responsible for the brown colouring and many of the organoleptic properties of foods. Despite the beneficial impact of MR in the sensory appreciation of foodstuffs by consumers, nutritional consequences such as the impairment

of lysine residues and the formation of potentially harmful compounds are to be expected (i.e. Friedman, 1996). The Maillard reaction has been shown to generate AA in thermally treated foods (Mottram, Wedicha, & Dodson, 2002; Stadler et al., 2002) and it is agreed that the main precursors are sugars and asparagine (Zyzak et al., 2003). AA has been classified as potentially carcinogenic to humans by IARC (1994). Hydroxymethylfurfural (HMF) is formed after 1–2 enolisation, dehydration and cyclization reactions from sugar caramelisation and Amadori product degradation at the advanced stage of the MR (i.e. Friedman, 1996; Kroh, 1994). Recently, some concern has arisen regarding the toxicological relevance of HMF, since in vitro studies of genotoxicity and mutagenicity have given controversial results (Janzowski, Glaab, Samimi, Schlatter, & Eisenbrand, 2000; Surh & Tannenbaum, 1994).

International organisations aim to evaluate exposure and risk assessment from dietary intake of AA, and two databases, one from the IRMM and another from the FDA, have been designed to compile results from laboratories. However, levels of AA in local foods which are largely

* Corresponding author. Tel.: +34 91 549 23 00; fax: +34 91 549 36 27.
E-mail address: fjmorales@if.csic.es (F.J. Morales).

consumed in specific regions are lacking in most databases. Recently, Bermudo, Moyano, Puignou, and Galceran (2006) and Yusa, Quintas, Pardo, Marti, and Pastor (2006) reported average levels of 400 µg/kg for one fried dough but the number of samples included in those studies was limited and not characterised.

In contrast, levels of HMF in different foods have been extensively studied and published for decades. HMF has been used traditionally to mark the extent of the MR, product deterioration during storage, and as a marker of potential adulteration. HMF is largely present in processed foods ranging from 0.9 mg/kg to several g/kg for meat products and caramel products, respectively (Bachmann, Meier, & Känzig, 1977). However, HMF levels in *churros* have never been published, and only Ramirez-Jimenez, Garcia-Villanova, and Guerra-Hernandez (2000) reported levels of about 10.7 mg/kg HMF in a type of fried doughnut (160 °C for 30–40 s).

This investigation is aimed at studying the formation of AA and HMF in *churros*, on a laboratory scale under controlled deep frying conditions.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

All chemical used were of an analytical grade and were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless mentioned otherwise. $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamide (isotopic purity 99%) was from Cambridge Isotope Labs (Andover, MA, USA). Methanol and acetonitrile (HPLC grade) were from Scharlau (Barcelona, Spain). Oasis-HLB cartridges (30 mg, 1 mL) were from Waters (Milford, MA, USA).

2.2. Samples and frying conditions

Fresh made commercial *churros* were randomly purchased at local producers ($n = 10$). For kinetic studies under controlled frying conditions, frozen commercial ready-to use dough for *churros* was obtained from a local producer (Antonio y Ricardo, S.A., Madrid, Spain) and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The dough was allowed to defrost overnight at $8\text{--}12\text{ }^{\circ}\text{C}$ before use. Dough strips 1.2 cm thick were rolled out to form a ribbon 10–11 cm length and 5.5–6.0 cm wide, and deep-fried at 180, 190 and 200 °C for 2, 3, 5 and 7 min in 3 l capacity domestic fryers (Solac, Model 513, 1850 watts, France). Experiments were done in triplicate. Four units of *churros* (containing 20–23 g of dough per unit) were placed in the basket to allow free movement but never below the oil surface during frying. The sample was turned every minute during the frying time. The sample:oil ratio was kept constant within a range of 0.025–0.030 g/g. High oleic content sunflower oil was used as frying oil as this oil is commonly used on an industrial scale. The temperature of the fryers had been calibrated previously, with external thermocouples (type K, 0.1 mm) being placed in the fryers and the temperature being continuously recorded by a datalogger. The oil was pre-

heated at the selected temperature for 15 min and after eighteen frying sessions the oil was discharged. After frying, samples were dried on paper, cooled to room temperature, processed, distributed in containers and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for analysis.

2.3. Moisture content

The moisture content was determined by a gravimetric method as described in AOAC-925.10 (AOAC, 1995). Samples were homogenized in a household cutter (Moulinette, Moulinex, Paris, France) and 2 g weighed into Chopin dishes. They were dried in a convection oven (Digiheat, JP-Selecta, Barcelona, Spain) till they reached a constant weight after three consecutive readings at $105 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analyses were carried out in duplicate.

2.4. Analysis of HMF and furfural

HMF and furfural determinations were performed according to Rufián-Henares, Delgado-Andrade, and Morales (2006).

2.5. LC-ESI-MS determination of acrylamide

A sample preparation as described by Şenyuva and Gökmen (2006) was used with minor modifications. A finely ground sample (0.450 g) was then weighed into a 10 mL centrifuge tube. The sample was spiked with 100 µL $^{13}\text{C}_3$ -labelled acrylamide (10 µg/mL) for recovery, and 5 mL of Milli-Q water was added. Then the mixture was vortexed, kept for five minutes at room temperature and subsequently homogenized for 1 min (Ultraturrax). Then, 500 µL Carrez I and 500 µL Carrez II solution were added, vortexed and left to stand for 10 min. Tubes were centrifuged at 5000 rpm for 15 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The clear supernatant (1 mL) was clarified onto a pre-conditioned HLB cartridge. The first drops were discharged and the rest of the eluate was collected in amberlite vials for analysis.

LC-ESI-MS analyses were performed as described by Morales, Rufián-Henares, and Arribas-Lorenzo (2007) using an Agilent 1100 HPLC system (Waldbronn, Germany) consisting of a quaternary pump, an autosampler and a temperature-controlled column oven, coupled to an Agilent 1100 MS detector equipped with an electrospray ionization interface. The analytical separation was performed on an Inertsil ODS-3 column ($250 \times 4.6\text{ mm}$, 5 µm) using an isocratic mixture of 0.2% aqueous solution of formic acid at a flow rate of 0.6 mL/min at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Data acquisition was performed, with a delay time of 8 min, in a selected ion monitoring (SIM) mode using the following interface parameters: a drying gas (N_2 , 100 psig) flow of 12 L/min, nebulizer pressure of 45 psig, drying gas temperatures $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, a capillary voltage of 3 kV and a fragmenter voltage of 70 eV. Monitored ions were 72.1 m/z for acrylamide and 75.1 m/z for $^{13}\text{C}_3$ -labeled acrylamide. Full scan analyses were performed in the mass range 50–200 for the

spectral identification of acrylamide in samples apart from the retention time. An acrylamide calibration curve was built in the range of 2–100 µg/L and a quantitation limit was determined at 18 µg/kg.

2.6. Colour determination

Colour was measured as reflectance in a Konica Minolta CM-3500d reflectance spectrophotometer (Konica Minolta Sensing INC, Japan) using the CIE Lab colour system, where L^* is lightness, the a^* parameter is redness and the b^* parameter yellowness (CIE Colorimetric Committee, 1974). Samples (3 g) were defatted three times with hexane (6 mL). Colour was measured in defatted samples to avoid any interference with oil absorbed components on the *churro* surface. The colour difference (ΔE) between processed and unprocessed samples was determined according to the following equation:

$$\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$$

ΔL^* being the brightness difference, Δa^* the redness difference and Δb^* the yellowness difference (Francis & Clydesdale, 1975). Results give the average from six readings.

2.7. Statistical Analysis

Analyses were performed using Statgraphics Plus, version 5.1, 2001 (Statistical Graphics Corp, Rockville, MD, USA). At least, two independent analyses were carried out per sample.

3. Results and discussion

Deep frying at 190 °C for 3–4 min is usually applied by local producers based on their practical experience since the process has not been automatised and still remains artisanal. Fig. 1 shows the changes in the moisture content of

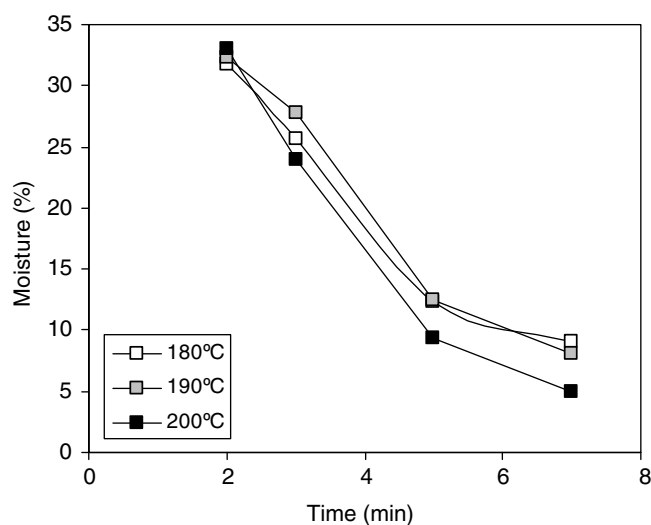


Fig. 1. Changes in the moisture content of *churros* during deep frying at different times and temperatures.

churros deep-fried at different combinations of temperatures (180, 190, and 200 °C) and time of frying (2, 3, 5 and 7 min). The loss of moisture is progressive relative to the frying time. When fried for the same length of time, the frying temperature was seen to have no significant impact on moisture content. However, lengthening the frying time proved critical regardless of the temperature. Moisture content ranged from 32% to 10–5% for 2 min and 7 min, respectively. During deep frying, the quantity of steaming water released from within the sample was determined by the frying conditions. Commercial *churros* are fried at high temperatures for a short period of time to avoid excessive oil penetration in the product and served a few minutes after frying to avoid subsequent hydration. Moisture content in freshly prepared industrial samples was 25.3 ± 4.8 ($n = 10$).

One of the most important physical changes during frying of *churros* is the darkening of the crust which is mainly a consequence of the MR. CIE-Lab* colour parameters were measured in defatted and ground portions of a sample to prevent a false reading produced by oil incorporated into the sample. In a cross-section, a brown surface ring of crust can be observed but the core still remains pale yellow and moist. The surface of the sample was neither uniform nor large enough to perform precise and representative readings. Furthermore, as it was not possible to remove the surface efficiently, the whole sample was ground and colour readings are related to the whole sample.

Fig. 2 depicts the evolution of the colour index for *churros* deep-fried at lab-scale. Contrary to what happened with moisture content, temperature has a more critical effect on the final colour than the processing time. Decrease in lightness is attributed to the formation of coloured pigments during the advanced and final stages of the MR in the crust and this process is enhanced at 200 °C. An average ΔE -value of 67.0 ± 2.8 ($n = 10$) was obtained in commercial samples. It is noteworthy that the coefficient of variation

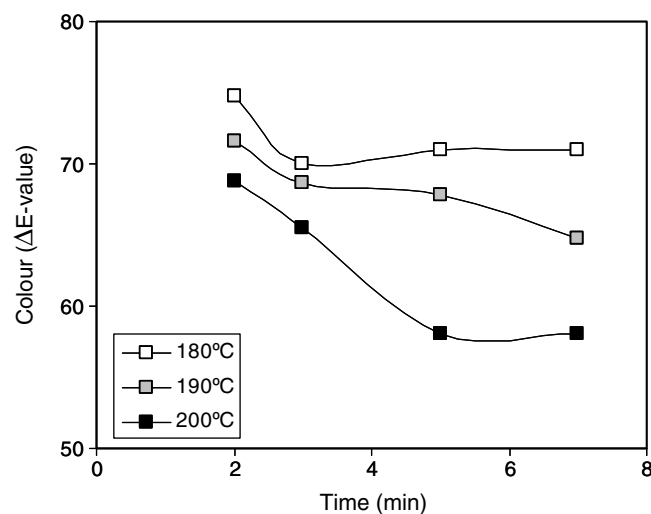


Fig. 2. Total colour changes (ΔE) in *churros* during deep frying at different times and temperature.

obtained was 4.1%, thus indicating that the final colour of the product is one of the most important parameters for defining the end of the frying process by local producers.

Accumulation of HMF was quantitatively more important when compared with furfural whose traces (<1 mg/kg) were barely detectable under severe frying conditions. Fig. 3 shows the evolution of HMF formation in *churros* during deep frying under controlled conditions. Before HMF formation, a lag-phase of up to 3 min can be clearly observed and is more relevant at lower temperatures. HMF marks the advanced stage of the MR and precursors should have formed previously. The average HMF content in commercial samples was 74.3 ± 47.5 mg/kg ($n = 10$) indicating an important variability among samples. Furfural was not detected in commercial samples. Results agree with the range of HMF obtained at laboratory scale. HMF formation was closely related to moisture content increasing exponentially at moisture levels lower than 10% (data not shown).

To our knowledge, there are no published results dealing with the AA content of *churros* and the influence of frying conditions. Fig. 4 plots the formation of AA in *churros* for different frying times and temperatures. AA only formed under the most severe frying conditions where an induction period of from 3 to 5 min, depending on the frying temperature, was observed. Frying temperature has a critical effect on the formation of AA. In the range of frying times commonly used by local producers, an increase of just 10 °C implies a two-fold increase in the levels of AA. For potato chips, a reference temperature of 175 °C has been calculated, but a higher temperature is necessary for *churros* in order to meet the product quality demanded by consumers. The average AA content in commercial samples was 46 ± 24.5 µg/kg ($n = 10$). In this investigation, potential AA formed from frying oil and incorporated into the sample was not considered since it has recently been confirmed that frying oil used in deep frying would not

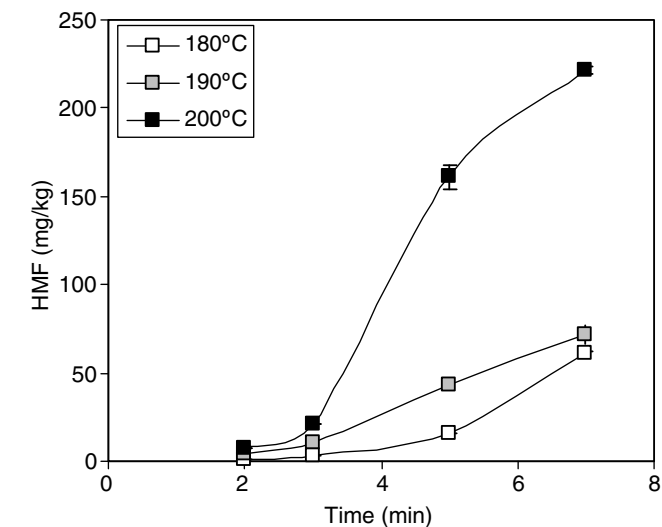


Fig. 3. HMF formation in *churros* during deep frying at different times and temperatures.

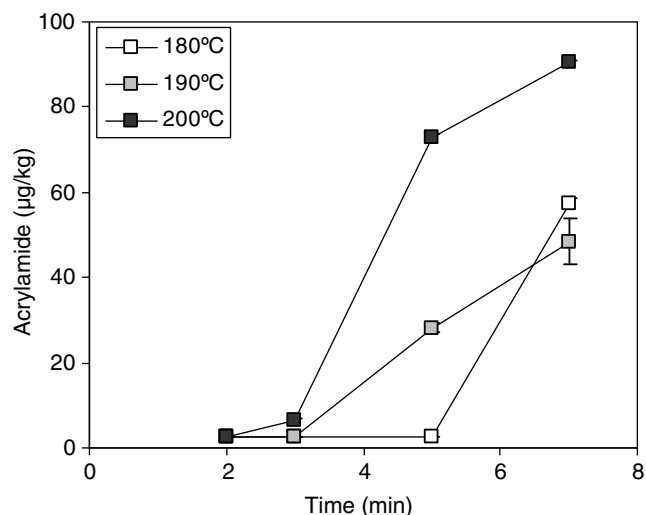


Fig. 4. Acrylamide formation in *churros* during deep frying at different times and temperatures.

contaminate foodstuffs with AA (Totani, Yawata, Takada, & Moriya, 2007).

HMF and AA content of deep-fried samples at lab-scale were correlated (Fig. 5). For both chemicals, an induction period was observed after which the formation of HMF and AA followed the same upward trend reaching values of about 90 mg/kg, and 60 µg/kg for HMF and AA, respectively. Optimal quality features for *churros* lie in this intermediate region of the graph. However, under more severe frying conditions, the two trends are modified and the reduced gradient of HMF formation is enhanced in comparison with that of acrylamide (Fig. 5, dotted line). This region consisted of over-processed *churros* where loss of colour quality by excessive darkening was noticeable. It is also plausible that evaporation loss or destruction of acrylamide at 200 °C becomes more relevant and subsequently the net formation of AA is reduced. Frying times of over 3 min at

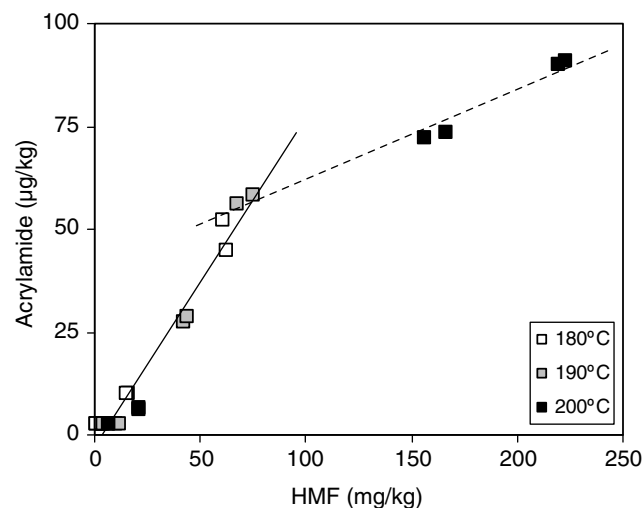


Fig. 5. The relationship between acrylamide and HMF in lab-scale samples deep-fried under controlled conditions.

200 °C cause excessive moisture loss and browning resulting in a loss of product quality.

Dehydration of the surface while maintaining a moist interior imparts a desirable taste and texture to *churros* but also involves MR and subsequently HMF and AA formation. Frying temperatures between 185 and 200 °C are commonly used to produce highly palatable *churros* with a crispy surface by local producers, but, HMF and AA levels nearly duplicate from 190 °C to 200 °C for the same frying times. It is critical to determine the end point of the frying process to minimise the formation of potentially harmful compounds in *churros*. Based on this experimental data, it should be possible to manufacture *churros* with reduced levels of AA and HMF by controlling the frying temperature and subsequently reducing their contribution to the dietary intake of the Spanish population.

Acknowledgements

This research was partly supported by a Scientific Research programme of the Comunidad de Madrid (ANALISYC Program, S-505/AGR-0312) and a European Collective Research Project (516415) supported by the Sixth Framework Programme for Research and Technological Development. G. Arribas-Lorenzo has a grant from the Consejería de Educación y Ciencia (Comunidad de Madrid). Ms. E. Ruiz and D. Gómez are thanked for their technical assistance.

References

- Association of official analytical chemists (1995). *Official methods of the association of official analytical chemists* (16th ed.). Washington, DC: AOAC.
- Bachmann, S., Meier, M., & Känzig, A. (1977). 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) in Lebensmitteln. *Lebensmittelchemie*, 51, 49–50.
- Bermudo, E., Moyano, E., Puignou, L., & Galceran, M. T. (2006). Determination of acrylamide in foodstuffs by liquid chromatography ion-trap tandem mass-spectrometry using an improved clean-up procedure. *Analytica Chimica Acta*, 559, 207–214.
- CIE Colorimetric Committee (1974). Technical notes: Working program on colour differences. *Journal of the Optical Society of America*, 64, 896–897.
- Francis, F. J., & Clydesdale, F. H. (1975). *Food colorimetry theory and applications*. Westport, CT: AVI (pp. 131–224).
- Friedman, M. (1996). Food Browning and its prevention: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 631–653.
- IARC (1994). *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans some industrial chemicals* (vol. 60). Lyon: International Agency for Research on Cancer (pp. 389–433).
- Janzowski, C., Glaab, V., Samimi, E., Schlatter, J., & Eisenbrand, G. (2000). 5-Hydroxymethylfurfural: Assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food Chemistry and Toxicology*, 38, 801–809.
- Kroh, L. W. (1994). Caramelisation of food and beverages. *Food Chemistry*, 45, 1570–1573.
- Morales, F. J., Rufian-Henares, J. A., & Arribas-Lorenzo, G. (2007). Acrylamide content of selected Spanish foods: Survey of biscuits and bread derivatives. *Food Additives and Contaminants*, 24, 343–350.
- Mottram, D. S., Wedicha, B. L., & Dodson, A. T. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419, 448–449.
- Ramirez-Jimenez, A., Garcia-Villanova, B., & Guerra-Hernandez, E. (2000). Hydroxymethylfurfural and methylfurfural content of selected bakery products. *Food Research International*, 33, 833–838.
- Rufian-Henares, J. A., Delgado-Andrade, C., & Morales, F. J. (2006). Application of a fast HPLC method for simultaneous determination of furanic compounds and glucosylisomaltol in breakfast cereals. *Journal of AOAC International*, 89, 161–165.
- Şenyuva, H. Z., & Gökmen, V. (2006). Interference-free determination of acrylamide in potato and cereal-based foods by a laboratory validated liquid chromatography–mass spectrometry method. *Food Chemistry*, 97, 539–545.
- Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., & Guy, P. A. (2002). Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419, 449–450.
- Surh, Y., & Tannenbaum, S. (1994). Activation of the Maillard reaction product 5-(hydroxymethyl)furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination. *Chemical Research Toxicology*, 7, 313–318.
- Totani, N., Yawata, M., Takada, M., & Moriya, M. (2007). Acrylamide content of commercial frying oil. *Journal of Oleo Science*, 56, 103–106.
- Yusa, V., Quintas, G., Pardo, O., Marti, P., & Pastor, A. (2006). Determination of acrylamide in foods by pressurized fluid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry used for a survey of Spanish cereal-based foods. *Food Additives and Contaminants*, 23, 237–244.
- Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovich, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., & Ewald, D. K. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4782–4787.

1.3. Efecto de los compuestos fenólicos y del grado de oxidación del aceite en sistemas modelo de galleta

El objetivo de este trabajo es investigar el efecto de los compuestos fenólicos del aceite de oliva así como el aceite termoxidado en la formación de acrilamida.

Para llevar a cabo dicho propósito se prepararon sistemas modelo de galletas a escala de laboratorio los cuales contenían aceite de oliva virgen de baja, media y alta concentración de compuestos fenólicos. Paralelamente, también se elaboraron galletas con aceite de girasol previamente termoxidado en condiciones controladas. Los sistemas fueron horneados a 190 °C durante diferentes tiempos. La técnica analítica empleada para la determinación de acrilamida fue LC-MS. Adicionalmente, se midieron otros parámetros como el color, la humedad, la capacidad antioxidante, así como el contenido en HMF, entre otros.

Los resultados mostraron que la concentración y la composición de los compuestos fenólicos afecta significativamente a la formación de acrilamida. Esta influencia es relevante a tiempos prolongados de horneado.

En las galletas elaboradas con aceite termoxidado, y en el mismo tiempo de horneado que en el estudio anterior, se observó un aumento considerable en los valores de acrilamida, un aumento en el desarrollo del color, así como en los niveles de HMF. Estos resultados pueden deberse a que el proceso de oxidación térmica del aceite favorece la formación de productos de oxidación lipídica tales como aldehídos, cetonas, etc. capaces de reaccionar de nuevo con los grupos amino. Se puede concluir que este efecto únicamente tiene lugar en determinadas condiciones de humedad, tiempo y temperatura.

Parte de este estudio se ha realizado en el Departamento de Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Nápoles “Federico II”, (Portici, Italia) durante el período comprendido entre febrero y marzo de 2008, bajo la supervisión del profesor Vincenzo Fogliano.

Los resultados de dicho trabajo se presentaron en el congreso *COST-927 Thermally processed foods: possible health implication* (Smolenice, Eslovaquia, 2008) como comunicación oral. Asimismo, ha sido publicado en la revista *European Food Research and Technology* bajo el

título ***“Acrylamide formation in a cookie system as influenced by the oil phenol profile and degree of oxidation”***.

Acrylamide formation in a cookie system as influenced by the oil phenol profile and degree of oxidation

Gema Arribas-Lorenzo · Vincenzo Fogliano ·
Francisco J. Morales

Received: 27 November 2008 / Revised: 21 January 2009 / Accepted: 26 January 2009 / Published online: 17 February 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract The purpose of this study was to investigate the effect of the olive oil phenolic compounds as well as of thermoxidised oil on the formation of acrylamide in a cookies system. Three virgin olive oils having different phenolic profile and a thermoxidised sunflower oil were selected. Cookies were baked at 190 °C for different times (8–16 min) following a basic recipe where type of oil was the variable. Additionally to acrylamide (AA), other parameters such as colour, moisture, antioxidant activity (AOA), and hydroxymethylfurfural (HMF) were measured. Results showed that concentration and composition of phenolic moiety of virgin olive oil significantly affect the acrylamide formation, particularly at prolonged baking time. Virgin olive oil with a higher dihydroxy/monohydroxy ratio was more efficient in the AA mitigation and AA was reduced up to 20%. Colour and AOA were not significantly different among the three types of oils. However, AA is dramatically increased when thermoxidised oil is used with a parallel increase of browning and HMF. It was concluded that lipid oxidation products should

be considered as an important factor in acrylamide formation during baking of fat-rich products.

Keywords Acrylamide cookie · Olive oil · Sunflower oil · Phenolic compounds · Thermoxidation · Carbonyl compounds

Introduction

Acrylamide (AA) monomer which is responsible of nervous system damage [1], may act as a carcinogenic [2] and mutagenic compound [3]. AA has been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as probably carcinogenic to humans [4]. AA is naturally formed mainly in carbohydrate rich foods during thermal treatment [5]. According to the most recent data, average human intake is estimated to be 0.4 µg/kg bw/day from 2 years of age onwards [6]. However, the intake may vary widely from 0.3 to 2 µg/kg bw/day or may reach even 5 µg/kg bw/day at the 99th percentile [6]. The main food commodities contributing to the AA exposure were French fries, potato crisps, coffee, biscuits and bread, while others food items contributed less than 10% of the total exposure [7]. All in all, the discovery of AA as new heat-induced toxicant in foodstuffs led to a public health concern and different National and International bodies aimed activities for risk evaluation.

Reducing sugars and asparagine are the most important precursors in the formation of acrylamide in foods linked to the Maillard reaction (MR) through the decarboxylation of the Schiff base in a Strecker-type reaction [8, 9]. Another possible, although secondary pathway reported for acrylamide formation is from lipid oxidation, triacylglycerols can hydrolyse to glycerol, forming acrolein from the

G. Arribas-Lorenzo · F. J. Morales
Consejo Superior de Investigaciones Científicas,
Instituto de Ciencia y Tecnología de los
Alimentos y Nutrición (formerly Instituto del Frío),
28040 Madrid, Spain

V. Fogliano
Dipartimento di Scienza degli Alimenti,
University of Napoli “Federico II”, via Università 100,
80055 Portici, Italy

F. J. Morales (✉)
Instituto del Frío, CSIC, José Antonio Novais 10,
28040 Madrid, Spain
e-mail: fjmorales@if.csic.es

thermal degradation which is a precursor of acrylamide [8, 10]. Acrylic acid may also rise from the oxidation of acrolein which can be found in the thermal degradation of lipids [11].

Due to the current interest of AA formation in cooked foods, several studies have been carried out in order to minimise its concentration in different food categories. Most effective approaches to be implemented at industrial scale have been compiled by the CIAA who developed a guide called Acrylamide Toolbox [12]. Recent investigations indicated that antioxidant compounds could be an effective tool to inhibit acrylamide production [13–15], but opposite evidence about the effect of antioxidant on acrylamide formation have also been reported. For instance, Tareke [16] found that the addition of antioxidants (butylated hydroxytoluene, sesamol, vitamin E) to meat before heating enhances the formation of acrylamide. This author hypothesised that antioxidants might protect acrylamide from further radical-initiated reactions. Vatterm and Shetty [17] reported that formation of acrylamide in fried potato slices previously treated with phenolic antioxidants from cranberry and oregano increased when exogenous phenolic is present. Rydberg et al. [18] mixing in homogenised potato ascorbyl palmitate and sodium ascorbate, as well as oxidants such as benzoyl peroxide and hydrogen peroxide, found that the effect on acrylamide content is small or nonexistent.

It is well known that MR and lipid oxidation are inter-related and the products of each reaction influence the development of the other. Recent findings from model system suggested that some lipid oxidation products can affect acrylamide formation [19]. But, studies on the influence of oxidised oil on acrylamide formation in food are scarce and mainly refer to French fries or potato crisps during the frying process [20]. Also, emulsions with acrylamide have been used to study the effect of the oxidised oil [21], but no studies have been carried out about the influence of thermoxidised oil as food constituent, particularly during baking of cookies. Indeed, recent papers dealing with acrylamide formation in baked products did not consider the variable of fat oxidation or fat oxidizability [22, 23].

In a previous study, we showed the relationship between the concentration of ortho-diphenolic compounds of the frying olive oil and acrylamide formation in potato crisps [24]. These phenolic compounds with antioxidant properties in virgin olive oil [25], demonstrated to be also effective in reducing the heterocyclic amines formation in meat [26]. Based on this knowledge, the main objective of this work was to investigate the effect of the oil composition on the acrylamide formation in a cookie system where oil is a part of the formulation. For this purpose, three virgin olive oils containing different profile of

phenolic compounds and a thermoxidised sunflower oil were used.

Materials and methods

Materials

All chemicals used were of analytical grade and were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless mentioned otherwise. $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamide (isotopic purity 99%) was from Cambridge Isotope Labs (Andover, MA, USA). Methanol and acetonitrile (HPLC grade) were from Scharlau (Barcelona, Spain). Potassium hexacyanoferrate, zinc sulphate, formic acid (98%) were of analytical grade and obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Ultra pure water was used throughout the experiments (Milli-Q system, Millipore Bedford, MA, USA). Oasis-HLB cartridges (30 mg, 1 mL) were supplied by Waters (Milford, MA, USA). Glass vials with septum screw caps were supplied by Agilent Technologies (Wilmington, DE, USA). Wheat flour, salt and sugar were sourced from local producers in Italy.

Methods

Dough preparation and baking conditions

The recipe of the model cookies was prepared according to Gökmen et al. [22] with some modifications. Recipes were formulated with 80 g wheat flour, 1 g salt, 17 g deionised water, 24 g oil, 1.2 g sodium bicarbonate and 35 g sugar. Recipes were identified according to the composition of the oils. The ingredients were thoroughly mixed, and dough was rolled out to discs with 5 cm of diameter and 2 mm of thickness using a manual laminator (Imperia, Lusso, sp 150 model, Bologna, Italy). In each trial, four cookies were prepared and baked at 190 °C for 8, 10, 12, 14 and 16 min in an oven without air convection (Rex, Electrolux, Pordenone, Italy). After baking, the samples were photographed, grinded and stored (Laboratory Blender, Waring Commercial, Torrington, USA). Two complete independent trials of baking were carried out to investigate the effect of phenolic compounds content and three independent trials were carried out for the experiment with thermoxidised oil.

Oil samples

Three different olive oils (VO) were used in the baking experiments: a refined olive oil purchased at local market with low phenolic compounds (LO, control), a virgin olive oil (from *Olea europaea* cv. *Coratina*) with intermediate

content in phenolic compounds (IO) and virgin olive oil (from *Olea europaea* cv. Ravece) rich in phenolic compounds (HO). The two virgin olive samples showed values of free acidity (0.1 and 0.2 g/100 g, respectively) peroxide number (10 and 13 mEqO₂/kg, respectively), and spectrophotometric indices (K232, K270 and ΔK) within the limits for extra VOs as defined by EC Regulation (CE) 1989/2003 relative to the characteristics of olive oils, olive pomace oils, and related analytical methods.

Thermostoxidised oil (TXSO) was prepared from sunflower oil (CSO, control). Sunflower oil (100 g) was weighed out in two open beakers and heated at 180 °C for 17 h in an oven (Memmert, Hannover, Germany). Both, control oil no-heating and oxidised oil, were used to prepare the dough. The degree of oxidation was measured as the peroxide value, determined by the standard iodometric method, according to the AOCS Official method Cd 8-53 [27]. The sunflower oil lipid peroxidation was determined by thiobarbituric acid reaction (TBA test). TBARS value was measured according to Fee and Teitelbaum [28]. Briefly, 1 g oil was mixed with 5 mL of distilled H₂O and 5 mL of hexane, vortexed, and the precipitate was removed by centrifugation at 1,800g for 10 min. After the addition of 1.5 mL of 0.6% (w/v) TBA, the supernatant was measured at 532 nm using a malondialdehyde (MDA) standard curve.

Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil

Extraction of phenolic compounds was performed according to the method of Cortesi et al. [29]. Briefly, olive oil (50 g) was dissolved in hexane (50 mL), and polar compounds were extracted with methanol/water (3:2, v/v, 3 × 30 mL). The final extract was washed with hexane (50 mL), and then the solvent was evaporated under reduced pressure at 40 °C. The residue obtained was weighed, dissolved in methanol, filtered through 0.2 μm filters (Amicon, Boca Raton, Florida), and used for determination of total phenolic compounds, HPLC separation, for LC–MS analysis.

Determination of tocopherol and total phenolic compounds content

The amount of phenolic compounds was given as gallic acid equivalents and determined according to the Folin-Ciocalteu method [30]. Briefly, 2.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent, diluted tenfold in water, was added to the different virgin olive oils. The mixture was incubated for 2 min at room temperature, and 2 mL of sodium carbonate was added. The mixture was incubated for 15 min at 50 °C and finally cooled in a water-ice bath. The specific absorbance

at 760 nm was immediately measured. Tocopherol content was determined according to Psomiadou et al. [31].

LC–MS analysis of virgin olive oils phenolic extracts

Virgin olive oils phenolic compounds were tentatively identified by LC–MS, as previously described [32]. HPLC runs were performed on a Shimadzu instrument configured with two LC-10AD pumps and a SLC10 A control system. Phenolic compound separation was performed on a Biosil C₁₈ HL 90-5S column (5 μm, 4.6 × 150 mm) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). MS analysis was carried out on an API-100 single quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with an atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) ion source.

The instrument used nitrogen as curtain gas and air to dry the ion spray. Preliminary experiments were also performed using an electrospray ion source (ESI). The HPLC equipment was connected to the described above using a flow rate of 0.8 mL/min. Ionisation was achieved at a temperature of 70 °C using a probe voltage of 4.8 kV and a declustering potential of 70 V. The mass-to-charge ratio scale was calibrated with the ions of ammonium adduct of polypropylene glycol. Full-scan spectra were acquired from 100 to 800 atomic mass units (amu) using a step size of 0.5 amu and a dwell time of 2 ms. Single ion monitoring (SIM) was performed simultaneously for four ions: 305, 321, 363 and 379 amu corresponding to the molecular ions (MH⁺) of the main phenolic compounds and to 357 for pinoresinol. In these experiments, a 500 ms dwell time was selected. Quantitative determination of secoiridoid compounds was obtained using a calibration curve constructed with oleuropein as standard; pinoresinol was quantified using a calibration curve obtained with pure standard.

LC–ESI–MS determination of acrylamide

Powdered sample (0.450 g) was weighed and mixed with 5 mL water in polypropylene centrifugal tubes. Mixture was spiked with 100 μL of a 10 μg/mL [¹³C₃]-acrylamide methanolic solution as internal standard and later homogenised (Ultra Turrax, IKA, Mod-T10 basic, Germany) for 1 min. Afterwards, sample was treated with 750 μL of each Carrez I and Carrez II solutions and centrifuged (9,000g for 10 min) at 4 °C. For sample clean up, Oasis-HLB cartridges were used. Cartridges were preconditioned with 1 mL methanol and 1 mL water. An aliquot of the clear supernatant (1 mL) was loaded onto the cartridge at a flow rate of 2 mL/min and first drops were discharged and the rest collected. Solution was filtered through a 0.45-μm filter into an amberlite LC–MS vial.

LC–ESI–MS analysis were performed as described by Rufian-Henares et al. [33] with minor modifications [34] using an Agilent 1100 liquid chromatograph coupled to an Agilent Quadrupole MS detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Analytical separation was achieved with an Inertsil ODS-3 column (25 × 0.46 cm, 5 µm) (GLC-Sciences, Tokyo, Japan) at 32 °C. Isocratic elution was achieved with a mobile phase of 0.2% formic acid in water at a flow rate of 0.6 mL/min. Electrospray ionisation in the positive ionisation mode was used. The MS detector operated in selected ion monitoring (SIM) mode at m/z ratios of 72.1 and 75.1 for acrylamide and [$^{13}\text{C}_3$]-acrylamide, respectively. A delay time of 8 min was selected to avoid the introduction of co-extracted matrix components into the MS instrument prior acrylamide elution. The needle and cone voltages were set at 3.0 kV and 100 V, respectively. Nitrogen was used as nebulizer gas (12.0 L/h) and the source temperature was set at 300 °C. Acrylamide was quantified using a linear calibration function that was established with standard solutions of acrylamide and [$^{13}\text{C}_3$]-acrylamide in Milli-Q water (5–100 µg/L). Acrylamide contents in sample extracts were calculated from the calibration slope and intercept value, taking into account the recovery calculated by means of [$^{13}\text{C}_3$]-acrylamide slope. The limit of the quantitation was set at 20 µg/kg. Precision (reproducibility) was lower than 12% and recovery between 84 and 109%. Recently, CSIC laboratory has participated in an EU validation study of IRMM (2008) for the determination of acrylamide in potato crisps with satisfactory results (z -score, −0.5). Additionally, a reference material (crispbread) from Proficiency test 3018 from FAPAS® (Central Science Laboratory, UK) was used, assigned value was 101 µg/kg and reported value was 103 µg/kg being satisfactory. The analysis is integrated within the scope of a certified laboratory controlled by AENOR (Spanish Association for Standardisation and Certification).

HPLC determination of HMF

HMF determination was based on the method of Garcia-Villanova et al. [35] with slight modifications. Ground sample (500 mg) was suspended in 5 mL of deionised water clarified with 0.25 mL each of potassium ferrocyanide (15% w/v) and zinc acetate (30% w/v) solutions. The resulting mixture was centrifuged at 4,000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected and two further extractions were performed using 2 mL of deionised water. The extracts were filtered (0.45 µm) and analysed by HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan). The mobile phase was a mixture of acetonitrile in water (5% v/v) at a flow rate of

1 mL/min under isocratic conditions and a Synergy 4 µm Hydro-RP 80A, 25 × 4.6 cm (Phenomenex) column. The UV detector was set at 280 nm and HMF was quantified using the external standard method within the range 0.025–75 mg/L. The limit of detection of the method was 0.010 mg/L while the reproducibility in cookies was 1.50% (CV). All the analyses were performed in triplicate and the results expressed as mg/kg sample.

Antioxidant activity assay

ABTS, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), assay for insoluble samples was carried out according to Serpen et al. [36]. The antioxidant capacity was expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) which is defined as the amount of Trolox (mmol) necessary to obtain the same antioxidant capacity.

Moisture content

The moisture content was determined by a gravimetric method as described in AOAC-925.10 [37]. Samples (~1 g) were weighed accurately into a test tube and they were dried until constant weight in oven at 105 °C. The experiment was carried out in duplicate.

Colour determination

Colour of baking cookies has been measured in units $L^*a^*b^*$ using a Konica Minolta CM-3500d reflectance spectrophotometer (Konica Minolta Sensing INC, Japan). $L^*a^*b^*$ is an international standard for colour measurements, adopted by the Commission Internationale d'Eclairage (CIE) [38] in 1974. L^* is the luminance or lightness component, which ranges from 0 to 100, and parameters a^* (from green to red) and b^* (from blue to yellow) are the two chromatic components. The colour (E) was determined according to the following equation:

$$E = (L^{*2} + a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

L^* being the brightness, a^* the redness and b^* the yellowness [39]. The instrument was calibrated each time with a white and a black ceramic plate. Each sample was scanned twice in three different places.

Statistical analysis

Data were analysed using Microcal Origin, version 7.5 (Origin Lab Corp, Massachusetts, USA). Values were presented as means ± SD. Differences with $P < 0.05$ were considered statistically significant using Tukey test.

Table 1 Main phenolic compounds (mg/kg) in the three virgin olive oils used in the different cookie recipes determined by LC–MS

Sample	3,4-DHPEA-EDA	3,4 DHPEA-EA	p-HPEA-EDA	p-HPEA-EA	Pinoresinol	Total phenolic	Dihydroxy/monohydroxy
HO	226	81	148	32	227	714	1.7
IO	80	46	111	26	104	367	0.9
LO	5	n.d.	10	n.d.	10	25	0.5

Total phenolic content is given as sum of the single compounds. In the last column the ratio between dihydroxy and monohydroxy secoiridoids is reported. Total phenolic content was expressed as gallic acid equiv (mg/kg)

LO low phenolic compounds content oil; IO intermediate phenolic compounds content oil; HO high phenolic compounds content oil; 3,4-DHPEA-EDA dialdehydic form of elenolic acid linked to hydroxytyrosol; 3,4 DHPEA-EA oleuropein aglycon; p-HPEA-EDA dialdehydic form of elenolic acid linked to tyrosol; p-HPEA-EA ligstroside aglycon

Results

Characterisation of virgin olive oil phenolic compounds and influence on formation of acrylamide

Three types of virgin olive oils (VO) were selected according to their content in phenolic compounds and classified according to their total phenolic profile by LC–MS in high (HO), intermediate (IO) and low (LO) content as reported in Table 1. Recorded values agreed with previous findings reported for Italian VO [24] being oleuropein (3,4 DHPEA-EA), ligstroside aglycon (p-HPEA-EA), the dialdehydic form of enolic acid linked to hydroxytyrosol (3,4-DHPEA-EDA) and tyrosol (p-HPEA-EDA) the main detectable compounds. HO had twofold more phenolic compounds than the IO, and also a higher ratio dihydroxy/monohydroxy derivatives. LO, which is a refined olive oil, had a concentration of phenolic compounds of less than one-tenth with respect to the original virgin oil. On the other hand, tocopherol content was not significantly different among samples being 201, 215 and 197 mg/kg in the HO, IO and LO, respectively.

LO, IO, and HO were used in the formulation of three cookie dough to investigate the effect of the olive oil phenolic profile on the formation of acrylamide during baking. Changes in acrylamide in the three recipes formulated with different oils were shown in Fig. 1. As expected, acrylamide increased with the time of baking for all the recipes in agreement with literature [40, 41], and no significant differences among recipes were found for short baking times. However, acrylamide levels were significantly higher in LO system when prolonging the baking time up to 16 min reaching a moisture content about 3.5%. As expected, moisture content decreased (from 7.0 to 3.5%) as baking time increased (from 8 to 16 min), but no significant differences were noticed among recipes. At 16 min of baking, formation of acrylamide was higher (805 µg/kg) in recipe LO than in the recipe formulated with HO (637 µg/kg), thus a reduction of 20% was noticed.

The effectiveness of VO on the reduction of AA was quantitatively correlated with the content of phenolic

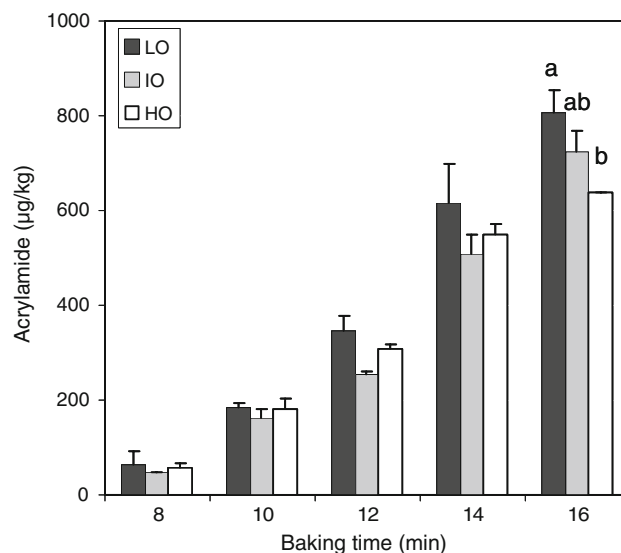


Fig. 1 Acrylamide formation in model cookies baked at 190 °C for different times and formulated with three VO samples (LO low phenolic compounds content; IO intermediate phenolic compounds content; HO high phenolic compounds content). Letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

compounds as showed in Fig. 2. There was an inverse linear relationship between the total phenolic compounds content and ortho-diphenolic content with AA in cookies baked for 16 min. The response (slope) for ortho-diphenolic compounds (-0.5504 , $r = 0.9956$) was double than total phenolic compounds (-0.2438 , $r = 0.9998$) showing that ortho-diphenolic could be one of the key contributing substances in the acrylamide reduction.

Effect of thermoxidised oil on the formation of acrylamide

Sunflower oil was used for the thermoxidation experiment since virgin olive oil has a higher resistance towards lipid oxidation [42]. Thus, two types of oils were used; TXSO (thermoxidised sunflower oil) and CSO (control sunflower oil). Peroxide values were 33.5 and 1.8 meq O_2 /kg for TXSO and CSO, respectively. TBARS was 1.98 nmol

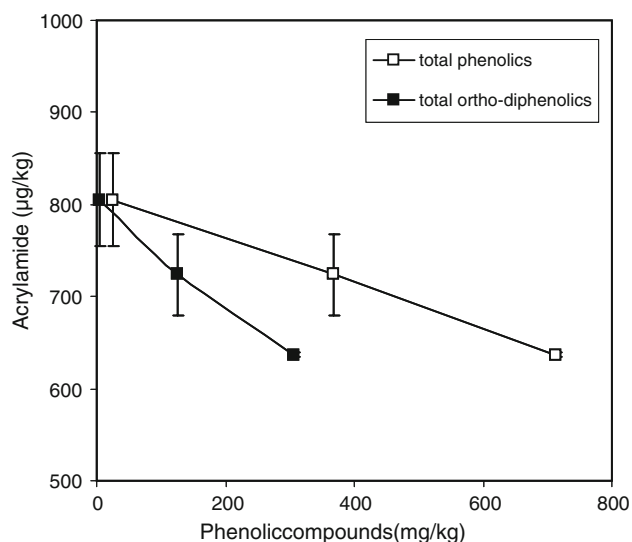


Fig. 2 Relationship between virgin olive oil phenolic compounds (total and ortho-diphenolics) and acrylamide formation in cookies baked at 190 °C for 16 min

MDA/g for TXSO while CSO had a TBARS value below the detection limit.

Acrylamide content in cookies systems, when the recipe was formulated with TXSO oil as compared with the control CSO, is showed in Fig. 3. Baking experiments using both oils showed similar content of acrylamide up to 14 min, but a different behaviour was found for the final cooking time. At 16 min, AA rapidly increased in cookies formulated with TXSO oil, and reaching levels about 59% higher as compared with CSO. This finding indicated that thermoxidised oil plays a role on the formation of acrylamide at prolonged

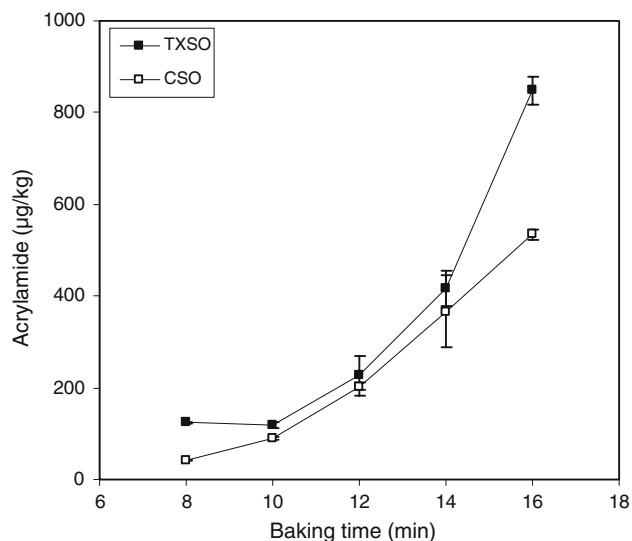


Fig. 3 Acrylamide formation in model cookies baked at 190 °C for different times and formulated with different types of olive oils and thermoxidised oil (CSO control sunflower oil; TXSO thermoxidised sunflower oil)

baking times, increasing abruptly acrylamide content on cookies baked with this oil. This experiment was completely repeated once again in four independent baking experiments and also using different starting CSO and TXSO (17 h of thermoxidation), but similar behaviour was obtained. The concentration of acrylamide was up to 136% higher in TXSO system. It can be concluded that the use of oxidised oil in the cookies formulation led to a huge increase in the formation of acrylamide during baking.

Effect of baking time on antioxidant activity (AOA)

In Fig. 4, the AOA of cookies baked with different type of oils at various baking times is reported. Baking increased

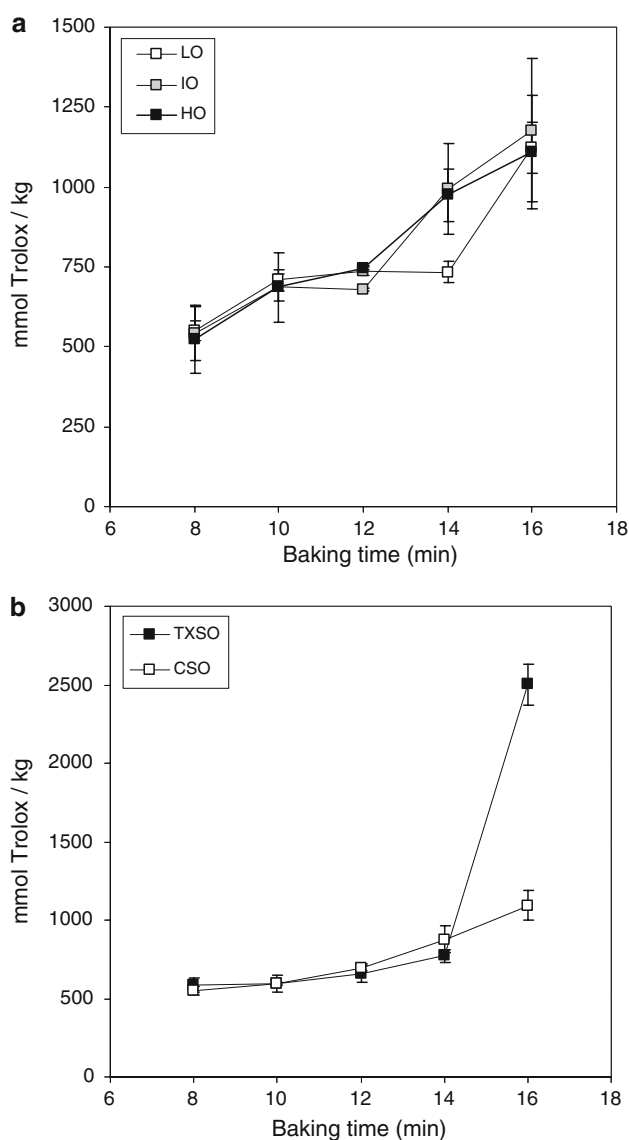


Fig. 4 Effect of baking time and oil composition on the antioxidant activity of cookies. **a** Effect of phenolic composition, **b** effect of thermoxidation. Labels as Fig. 1

the antioxidant capacity in all the recipes in agreement with other authors [23], but there were no differences among the formulations containing VO with different phenolic concentrations, suggesting that the increase of the antioxidant activity was mainly due to the development of the MR. On the other hand, cookies formulated with TXSO oil showed a significant increase of antioxidant activity at 16 min of baking. Again, this result pointed out that final products of lipid peroxidation feedback the MR in different stages promoting the formation of substances with antioxidant activity, as previously observed for acrylamide.

Colour development

The effect of baking time and oil composition on the colour index is shown in Fig. 5a. These results indicated a linear

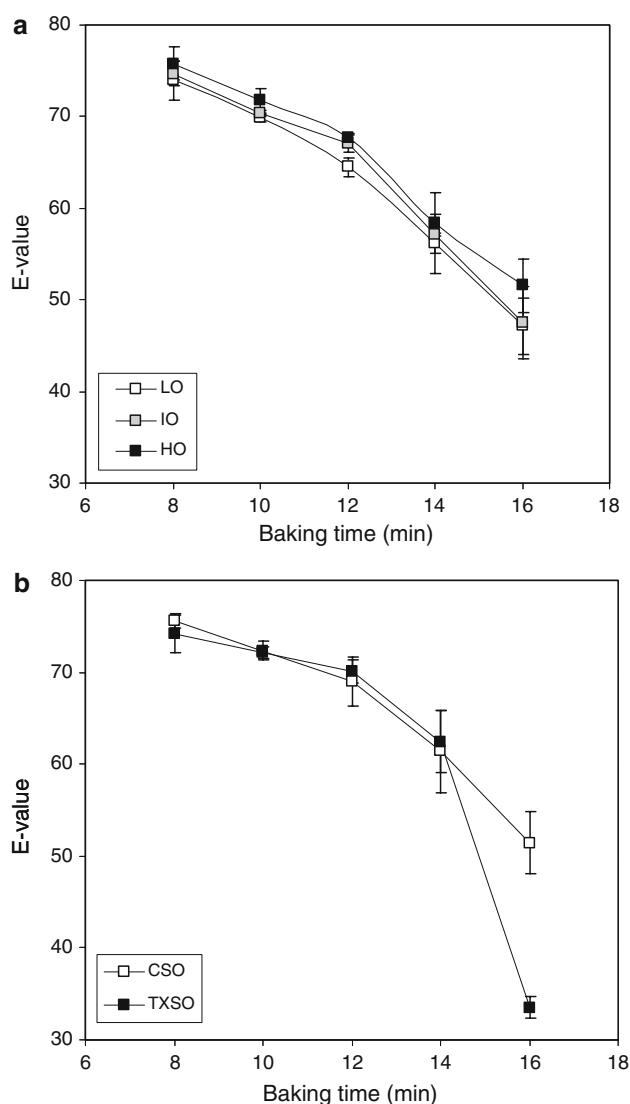


Fig. 5 Effect of baking time and oil composition on the colour of cookies. **a** Effect of VO phenolic composition, **b** effect of oil thermoxidation. Labels as Fig. 1

decrease in the *E*-value with the baking time since the intensity of browning increased with baking time due to MR and caramelisation. Lightness parameter (L^*) has a strong influence in the calculation of *E*-value. A rapid loss of luminosity is translated in a reduction of the L^* value and consequently in the *E*-value. Data did not show statistically different *E*-values for the three VO used, concluding that the colour did not change significantly when different concentrations of phenolic compounds in the oils were used. This result confirms our previous findings in a potato crisp frying system [24].

The influence of thermally oxidised oil on colour was also investigated (Fig. 5b). The colour values (*E*-value) for TXSO were similar to values obtained for cookies formulated with control CSO until 14 min whereas a more rapid decrease was observed from 14 to 16 min in thermally oxidised oil. Thus, after 14 min, these biscuits became very dark.

Correlation between colour development and acrylamide formation

The correlation between acrylamide content and browning (*E*-value) for the recipes containing olive oil with different content of phenolic compounds and system with thermoxidised oil are reported in Fig. 6a and Fig. 6b, respectively. Results showed a linear correlation between colour and acrylamide formation regardless the type of oil used in the formulation; following an average regression equation of $AA = -26.082 \times E\text{-value} + 2003.86$ ($r^2 = 0.997$). Lower levels for *E*-value reflect higher browning and higher formation of AA. However, in the Fig. 6b, it can be observed that *E*-value was significantly lower when TSXO was used. Colour changed significantly (*E*-value varied between 74 and 34) and AA content increased dramatically from 123 to 848 $\mu\text{g}/\text{kg}$ compared to the control oil showing less increase both in colour (*E*-value varied between 76 and 51) and acrylamide content (43–535 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Regression equations were; $AA = -20.486 \times E\text{-value} + 1622.3$ ($r^2 = 0.989$) and $AA = -17.980 \times E\text{-value} + 1469.8$ ($r^2 = 0.977$) for control and TSXO systems, respectively.

Influence of phenolic compounds and oil thermoxidation on the formation of HMF

Briefly, addition of olive oil with different profile in phenolic compounds did not show an effect on HMF formation. HMF was not detected at 8, 10 and 12 min of baking, but levels increased from 1 to about 9 mg/kg for 14 and 16 min, respectively. However, presence of TSXO largely enhanced HMF formation at the end of baking

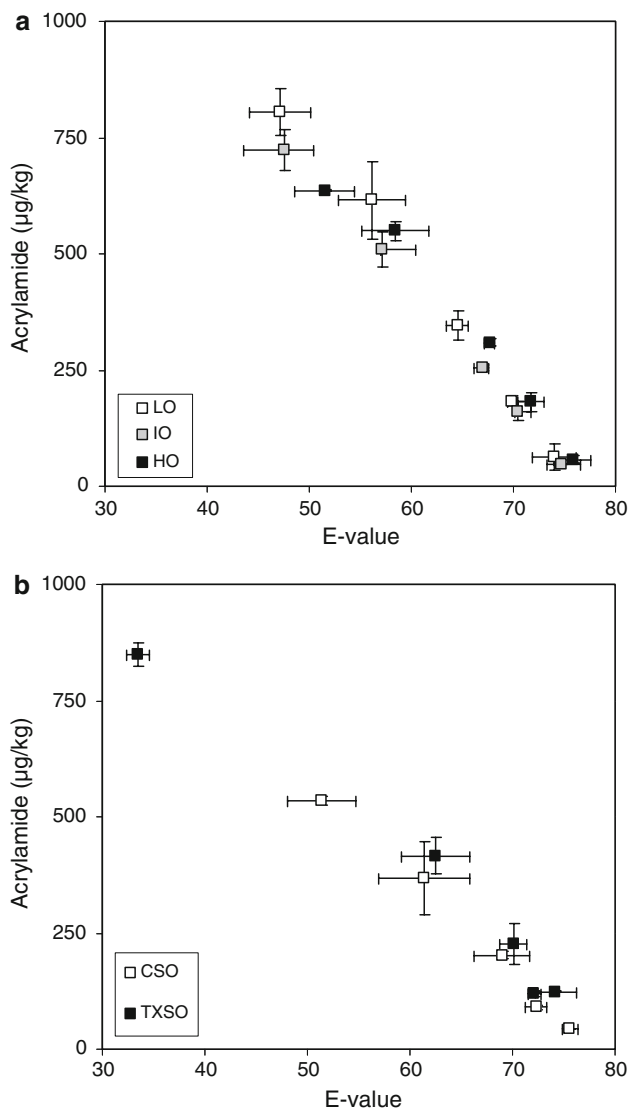


Fig. 6 Relationship between colour (*E*-value) and acrylamide content in cookies formulated with different types of oils. **a** Effect of virgin olive oil phenolic content, **b** effect of thermoxidised sunflower oil. Labels as Fig. 1

compared to fresh oil, being 248 and 5 mg/kg for TSXO and control, respectively.

Discussion

The large number of textural, physicochemical and organoleptic changes which take place during baking are very important to consumers' acceptance. MR, caramelisation and lipid oxidation are the most relevant chemical reactions during baking process.

The interplay between lipid oxidation and MR has been widely described [43], and it is known that oxidised lipids compete very efficiently with carbohydrates for MR.

Ehling et al. [44] showed, in model systems, that acrylamide is formed during fats heating in presence of asparagine, and that polyunsaturated oils gave significantly higher amounts of acrylamide than fats less easy to oxidise. Recently, the ability of specific lipid oxidation products to enhance the formation of acrylamide was demonstrated both in lipids [19] and sugar/amino acids model systems [45].

In this framework, data obtained showed that there was an inverse relationship between the amount of phenolic compounds and acrylamide formed during baking. This finding supported the hypothesis that VO phenolic compounds could be able to block the radical-mediated degradation of sugars from caramelisation and/or to delay the formation of lipid oxidation products that will increase acrylamide formation [19]. Polar antioxidants such as VO phenolic compounds act very efficiently at the interface between fat and wheat (i.e. the conditions of the dough) [46]; therefore, they could be also particularly efficient in scavenging dicarbonyls formed through MR. A similar effect was already reported in our previous study showing a reduction of acrylamide in potato crisps fried in VO having high content in phenolic compounds [24].

VO is mainly constituted by monounsaturated fatty acid and it is protected from oxidation by phenolic compounds and by tocopherol, so a thermoxidised sunflower oil was used to investigate the effect of oil oxidation on the formation of the acrylamide. Data clearly showed that the use of thermoxidised oil markedly enhanced acrylamide formation. Probably, there are different possible explanations for this finding. During thermoxidation of the oil, unstable hydroperoxides are formed; they are converted into secondary oxidation products such as short-chain acids, epoxides, aldehydes and ketones [47–49]. These highly reactive carbonyl compounds enhanced MR and therefore, probably influenced the formation of acrylamide [45]. It is worth noticing that acrylamide concentration significantly increased only at the final cooking time. This suggested that lipid oxidation products promoted acrylamide formation only at specific conditions of moisture, time and temperature.

It is known that mechanism for acrylamide formation involves the formation of a Schiff base from the reaction of a carbonyl compound with asparagine, followed by decarboxylation in a Strecker-type reaction to give an unstable intermediate. Hydrolysis of the decarboxylated Schiff base gives 3-APA which on elimination of ammonia yields acrylamide. It was established that the activity of carbonyl compounds determines the reaction rate: in model systems, the highest yields of acrylamide are obtained for hydroxycarbonyls as compared with sugars. Recently, Ait-Ameur et al. [50] confirmed the formation of aldehydes

(mostly, E,E,2,4-decadienal and nonanal) in a cookie model system heated at 300 °C up to 10 min and they found that their concentrations decreased after 6–8 min of baking due to reaction with dough proteins. In addition to reducing sugars, other carbonyl compounds, including lipid peroxidation products are also able to react with amino groups. Lipid oxidation produces a number of carbonyl derivatives which feedback the Maillard reaction. Hidalgo and Zamora [51] showed that 4,5-epoxy-alkenals, a lipid oxidation product, also produce the Strecker degradation of amino acids. Furthermore, final lipid oxidation products are able to react with amino acids to form their corresponding Strecker aldehydes [43]. It was recently described that some lipid oxidation products, particularly 2,4-decadienal, promoted acrylamide formation [19]. Hence, it is plausible that the higher yields of carbonyls in the thermoxidised oil could be responsible for significant increase of the acrylamide formation in cookies.

These results are also in agreement with other authors that stated the possible effect of deep-frying on the acrylamide formation [48, 52], but these results were not consistent with earlier findings in model systems [20, 21, 53] where oil oxidation did not significantly influence acrylamide formation.

Data showed a linear increase of the antioxidant activity during cooking which confirm our previous finding [54] and are probably due to the formation of enediol structures reductones which break the radical chain by donation of hydrogen. The direct procedure adopted by Serpen et al. [36], which avoided sample extraction, proved to be particularly suitable for dry system rich with poorly soluble MRPs such as cookies. In fact, the increase of the antioxidant activity is mainly due to the formation of insoluble component which cannot be detected using the conventional extraction-dependent protocols. On the other hand, it was surprising that the three oils with different content in phenolic compounds did not confer different value of antioxidant activity in the final product.

The correlation between colour development and acrylamide formation has been largely reported [22, 55, 56]. The correlation between colour and acrylamide formation in our system, particularly in the case of thermoxidised oil, suggested that the action of phenolic compounds in this system is not specifically on acrylamide pathway, but on the overall formation of carbonyl compounds both from MR or lipid oxidation. In fact, the strong browning development and the huge formation of HMF using thermoxidised oil may be attributed to the formation of coloured products during the advanced stages of the lipid oxidation such as low molecular weight monomers like 4,5-epoxy-2-alkenals or 4-hydroxyalkenals [57]. These carbonyl compounds promote acrylamide formation and consequently, change the surface browning.

Conclusion

The presence of virgin oil phenolic compounds in the formulation of the dough significantly affects the acrylamide formation in a cookie model system. Reduction up to 20% could be achieved at moderate baking conditions (190 °C). Mechanism of action is not fully understood, however, antioxidants might minimise the extent of the reactions mediated by carbonyl compounds derived by lipids, as recently observed also in a fats-rich cocoa model system [58]. Our investigation also supports the hypothesis that secondary lipid oxidation products actively participated in the formation of acrylamide in fat-rich foods. Our working hypothesis and a future research requirements in this field is that phenolic compounds, thanks to their intermediate polarity, are positioned at the interface between lipid and hydrophilic environment. They could act on one by side blocking the radical-mediated degradation of sugars and on the other by delaying the formation of lipid oxidation products. In both cases, the outcome is the reduction of the reactants available for acrylamide formation. Lipids have been traditionally omitted from the schemes of acrylamide formation in foods, but this research suggested that in a cookie model, the oil characteristics can significantly affect the final concentration of acrylamide.

Acknowledgments Assunta Siani and Edoardo Capuano are thanked for the VOO sampling and technical assistance. This work was carried out in the framework of COST 927-Thermally processed foods: possible health implication. Research has been partly fund by Consejería Educación y Ciencia (CAM) under project (ANALISYC Program, S-505/AGR-0312) and Comunidad de Madrid (PhD grant Gema Arribas-Lorenzo).

References

- LoPachin RM, Lehning EJ (1994) *Neurotox* 15:247–260
- Friedman MA, Dulak LH, Stedham AM (1995) *Fund Appl Toxicol* 27:95–105
- Segerbäck D, Callemann J, Schroeder JL, Costa LG, Faustman EM (1995) *Carcinogenesis* 16:1161–1165
- RC IA (1994) Acrylamide. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France
- Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Tornqvist M (2002) *J Agric Food Chem* 50:4998–5006
- WHO/JECFA (2005) 64th meeting, Rome, 7–17 Feb 2005. http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en/summary_report_64_final.pdf
- Boon PE, Mul A, van der Voet H, van Donkersgoed G, Brette M, van Klaveren JD (2005) *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagenesis* 580:143–155
- Becalski A, Lau BPY, Lewis D, Seaman SW (2003) *J Agric Food Chem* 51:802–808
- Yaylayan VA, Wnorowski A, Perez-Locas C (2003) *J Agric Food Chem* 51:1753–1757
- Gertz C, Klostermann S (2002) *Eur J Lipid Sci Technol* 104:762–771
- Umano K, Shibamoto T (1987) *J Agric Food Chem* 35:909–912

12. CIAA (2007) Confederation of the Food and Drink Industries in the UE. The CIAA acrylamide "Toolbox". Rev. 11, December, 2007. <http://www.ciaa.be/documents/brochures/toolbox%20rev11%20nov%202007final.pdf>
13. Morales F, Capuano E, Fogliano V (2008) *Ann N Y Acad Sci* 1126:89–100
14. Claus A, Carle R, Schieber A (2008) *J Cereal Sci* 47:118–133
15. Friedman M, Levin CE (2008) *J Agric Food Chem* 56:6113–6140
16. Tareke E. (2003) PhD thesis, Department of Environmental Chemistry, Stockholm University, Sweden
17. Vatter DA, Shetty K (2003) *Innov Food Sci Emerg Technol* 4:331–338
18. Rydberg P, Eriksson S, Tareke E, Karlsson P, Ehrenberg L, Tornqvist M (2003) *J Agric Food Chem* 51:7012–7018
19. Zamora R, Hidalgo F (2008) *J Agric Food Chem* 56:6075–6080
20. Mestdagh F, De Meulenaer B, Van Peteghem C (2007) *Food Chem* 100:1153–1159
21. Hedegaard RV, Granby K, Franden H, Thygesen J, Leif HS (2008) *Eur Food Res Technol* 227:519–525
22. Gökmen V, Acar OC, Koksel H, Acar J (2007) *Food Chem* 104:1136–1142
23. Summa C, Wenzl T, Brohee M, De la Calle B, Anklam E (2006) *J Agric Food Chem* 54:853–859
24. Napolitano A, Morales F, Sacchi R, Fogliano V (2008) *J Agric Food Chem* 56:2034–2040
25. Visioli F, Galli C (1998) *J Agric Food Chem* 46:4292–4296
26. Persson E, Graziani G, Ferracane R, Fogliano V, Skog K (2003) *Food Chem Toxicol* 41:1587–1597
27. AOAC Official Methods of Analysis (1980) 13th edn, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, pp 440–441
28. Fee JA, Teitelbaum HD (1972) *Biochem Biophys Res Commun* 49:150–153
29. Cortesi N, Ponziani A, Fedeli E (1981) *Rivista-Italiana-delle-Sostanze-Grasse* 58:108–114
30. Singleton VL, Rossi A (1965) *Am J Enol Vitic* 16:144–158
31. Psomiadou E, Tsimidou M, Boskou D (2000) *J Agric Food Chem* 48:1770–1775
32. Monti SM, Ritieni A, Sacchi R, Skog K, Borgen E, Fogliano V (2001) *J Agric Food Chem* 49:3969–3975
33. Rufián-Henares JA, Arribas-Lorenzo G, Morales FJ (2007) *Food Addit Contam* 24:343–350
34. Morales FJ, Arribas-Lorenzo G (2008) *Food Chem* 109:421–425
35. García-Villanova B, Guerra-Hernández E, Martínez-Gómez E, Montilla J (1993) *J Agric Food Chem* 41:1254–1255
36. Serpen A, Gökmen V, Pellegrini N, Fogliano V (2008) *J Cer Sci* 48:816–820
37. Association of Official Analytical Chemists AOAC (1995) Official methods of the association of official analytical chemists, 16th edn. Washington, DC
38. CIE Colorimetric Committee (1974) Technical notes: working program on colour differences. *J Op Soc Am* 64:896–897
39. Francis FJ, Clydesdale FH (1975) *Food colorimetry theory and applications*. AVI Publishing, Westport, CT, pp 131–224
40. Gökmen V, Acar OC, Arribas-Lorenzo G, Morales FJ (2008) *J Food Eng* 87:380–385
41. Taeymans J, Wood P, Ashby I, Blank A, Studer RH, Stadler P, Gondé P, Van Eijck S, Lalljie H, Lingnert M, Lindblom R, Matissek D, Müller D, Tallmadge J, O'Brien S, Thompson D, Whitmore T (2004) *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:323–347
42. AOCS (1998) In: Firestone D (ed) *Method Cd 8–53*. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society, 5th edn. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL
43. Zamora R, Hidalgo FJ (2005) *Crit Rev Food Sci Nutr* 45:49–59
44. Ehling S, Hengel M, Shibamoto T (2005) In: Friedman M, Mottram DS (eds) *Chemistry and safety of acrylamide in food*. Springer, New York, pp 223–233
45. Yuan Y, Zhao G-H, Hu X-S, Wu J-H, Liu J, Chen F (2008) *Eur Food Res Technol* 226:1301–1307
46. Frankel EN, Huang S-H, Aeschbach R, Prior E (1996) *J Agric Food Chem* 44:131–135
47. Frenkel EN (2005) *Lipid oxidation*, 2nd edn, Chap 4. The Oily Press, Bridgewater
48. Gertz C (2004) *Eur J Lipid Sci Technol* 106:736–745
49. Nawar WW (1998) *Grasas y Aceites* 49:271–274
50. Ait-Ameur L, Rega B, Giampaoli P, Trystram G, Birlouez-Aragon I (2008) *Food Chem* 111:758–763
51. Hidalgo FJ, Zamora R (2004) *J Agric Food Chem* 52:7126–7131
52. Gertz C, Klostermann S, Kochhar SP (2003) *Oleagineux Corps Gras Lipides* 10:297–303
53. Mestdagh M, Castelein P, Van Peteghem C, De Meulenaer B (2008) *J Agric Food Chem* 56:6141–6144
54. Nicoli MC, Anese M, Parpinel M (1999) *Trends Food Sci Technol* 10:94–100
55. Mustafa A, Andersson R, Rosen H, Kamal-Eldin A, Aman P (2005) *J Agric Food Chem* 53:5985–5989
56. Surdyk N, Rosen J, Andersson R, Aman P (2004) *J Agric Food Chem* 52:2047–2051
57. Hidalgo FJ, Zamora R (2000) *Grasas y Aceites* 51:35–49
58. Oliviero T, Capuano E, Cammerer B, Fogliano V (2009) *J Agric Food Chem* 57:147–152

Capítulo 2

Desarrollo de un método analítico para la determinación de glioxal y metilglioxal en galletas. Estudios sobre la influencia de compuestos dicarbonílicos en la formación de acrilamida e hidroximetilfurfural

2.1. Análisis, distribución y exposición dietética de glioxal y metilglioxal en galletas

El objetivo de este segundo capítulo es desarrollar un método que permita llevar a cabo la determinación de glioxal y metilglioxal en galletas, y así estudiar su relación con la formación de acrilamida e HMF.

Para la separación y detección de los compuestos 1,2-dicarbonílicos se empleó HPLC-UV, previa derivatización con orto-fenilendiamina (OPD) para formar los correspondientes derivados de quinoxalina. A continuación se presenta la reacción que tiene lugar.

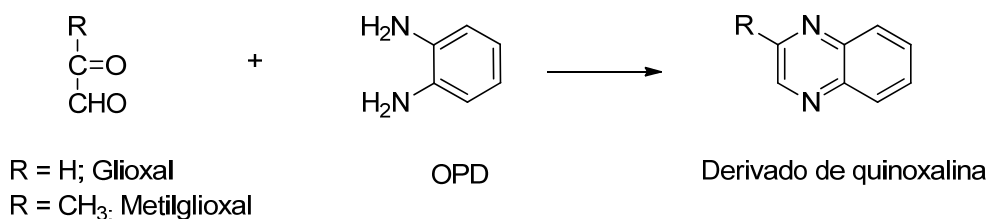


Figura 12. Reacción de glioxal y metilglioxal con OPD para la formación de sus correspondientes derivados de quinoxalinas.

Como en toda separación y con el fin de obtener una mejor resolución, se evaluaron y optimizaron los parámetros más influyentes: la columna analítica, la fase móvil, la relación peso de muestra/volumen de extracción y el porcentaje de mezcla de los disolventes empleados. El tipo de extracción empleado no fue selectivo, por lo que además de los compuestos de interés también se extrajeron muchos otros (por ejemplo la 3-deoxiglucosona). Estos compuestos pueden actuar como interferentes a la hora de la separación y cuantificación final con las técnicas existentes en los laboratorios de análisis de rutina, como es el caso de HPLC-DAD utilizada en este trabajo. Con el fin de eliminar dichas interferencias se realizó un proceso de SPE que fue optimizado para obtener mejores recuperaciones.

Las condiciones óptimas de extracción y elución de los compuestos objeto de estudio fueron las siguientes: una relación 1:10 (g muestra/mL), empleando como disolvente de extracción una mezcla de metanol:buffer fosfato (50:50, v/v), y como cartucho de SPE los Oasis HLB. Finalmente, la elución se llevó a cabo con una fase móvil formada por metanol y agua acidificada con 0,5% de ácido acético (60:40, v/v) y una columna analítica ACE C₁₈.

Las curvas de calibrado obtenidas mostraron buena linealidad en el rango de concentraciones estudiado (0,01-0,8 µg/mL). Los límites de cuantificación calculados fueron de 1,5 y 2,0 mg/kg para el glioxal y metilglioxal, respectivamente. El método analítico presentó buena precisión, con RSDs menores a 7% en todos los casos y con recuperaciones dentro del intervalo de 97 a 114% utilizando un patrón interno ($^{13}\text{C}_3$ -acrilamida).

Tras la validación interna, el método se aplicó a 26 muestras de galletas comerciales obteniéndose valores medios de 15,0 mg/kg y 29,9 mg/kg para el contenido en glioxal y metilglioxal, respectivamente.

Con objeto de evaluar el efecto del horneado en la formación de glioxal y metilglioxal, se prepararon en el laboratorio una serie de modelos de galletas y se hornearon a 190 °C durante diferentes tiempos. Los resultados confirmaron la dependencia de la concentración de los compuestos 1,2-dicarbonílicos con la extensión del procesado. Además, se demostró una relación directa entre la acrilamida y el HMF con los compuestos dicarbonílicos en las condiciones de horneado estudiadas. Con respecto a las galletas comerciales, se observó también una relación significativa con la acrilamida aunque no con el HMF. Las galletas con los niveles más elevados en metilglioxal y acrilamida correspondieron a aquéllas elaboradas con bicarbonato amónico y/o fructosa.

Finalmente, la exposición dietética de la población española al glioxal y metilglioxal a través de las galletas fue estimada en 213 y 216 µg/persona/día.

Este artículo ha sido publicado en la revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry* con el título de ***“Analysis, distribution, and dietary exposure of glyoxal and methylglyoxal in cookies and their relationship with other heat-induced contaminants”***.

Analysis, Distribution, and Dietary Exposure of Glyoxal and Methylglyoxal in Cookies and Their Relationship with Other Heat-Induced Contaminants

GEMA ARRIBAS-LORENZO AND FRANCISCO J. MORALES*

Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto del Frío-ICTAN, Jose Antonio Novais 10,
28040 Madrid, Spain

Thermal processing of food leads to the formation of dicarbonyls such as glyoxal (GO) and methylglyoxal (MGO), which are potentially harmful because they are precursors of advanced glycation end products (AGEs). GO and MGO formation was examined during the baking process of cookies as cookies are a widely distributed food commodity in Western diets. GO and MGO were chromatographically analyzed after employment of an improved method of derivatization with orthophenylenediamine to produce stable quinoxaline derivatives. Sample extraction, cleanup, and chromatographic conditions were evaluated to provide an in-house validated procedure for GO and MGO analysis in cookies. Quantification limits were set at 1.5 and 2 mg/kg for GO and MGO, respectively, with an average recovery of 103% and a calculated precision lower than 7%. Studies were carried out both on laboratory-scale cookies under controlled conditions and on commercial samples as well. GO and MGO values in commercial cookies ranged from 4.8 to 26.0 mg/kg and from 3.7 to 81.4 mg/kg, respectively. Commercial cookies made from ammonium bicarbonate and fructose showed the highest levels of MGO. Dicarbonyls were rapidly formed on the upper side of the cookie regardless of the shape or thickness of the samples, confirming there was a surface effect. Under controlled baking conditions, the formations of GO and MGO were linearly correlated with baking time. MGO formation was related with acrylamide, a heat-processing contaminant, in commercial cookies, but this relationship was not observed for 5-hydroxymethylfurfural. Dietary exposure of the Spanish population to GO and MGO from cookies was estimated to be 213 and 216 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$, respectively.

KEYWORDS: Glyoxal; methylglyoxal; cookies; acrylamide; hydroxymethylfurfural

INTRODUCTION

Since the last century, α -dicarbonyl research has become an interesting field in both food chemistry and medical science, mainly due to the implications of α -dicarbonyls in public health (1–3). Glyoxal (GO) and methylglyoxal (MGO) have been given special attention because they are reactive intermediates formed by heat processing such as roasting, frying, and baking, as well as by food storage. α -Dicarbonyls are not only known to be important precursors of color and aroma substances but also lead to protein modifications with nutritional consequences. In vivo, dicarbonyls react irreversibly with proteins, forming advanced products analogous to those found in non-enzymatically glycosylated proteins, which are characteristic in aging, atherosclerosis, and diabetic and uremic subjects (4). Their presence suggests potential health risk issues related to mutagenicity and carcinogenicity (5, 6), with GO causing DNA lesions (7) both in vitro and in vivo studies. MGO inhibits protein, DNA, and RNA synthesis in villus and crypt cells as well as in colonocytes, which are associated with genotoxicity in experimental

animals (6). However, information about the effects on humans is limited and basically related to allergic reactions (8, 9). The potential pathophysiological role of GO and MGO is therefore under investigation in the biomedical area due to the toxicity of these compounds (10).

In food, α -dicarbonyls are formed by the reaction of amino groups in proteins with reducing sugars (Maillard reaction), by the degradation of sugars during caramelization, and by lipid peroxidation, apart from there being an enzymatic origin in fermented foods (11–13). These toxic carbonyl species have been found in several foods such as honey, with levels in the ranges of 0.2–2.7 and 0.4–5.4 mg/kg for GO and MGO, respectively (14), and in fermented products such as wine (up to 1556 $\mu\text{g}/\text{L}$) (15) and beer (230–1000 $\mu\text{g}/\text{L}$) (16), where they are enzymatically formed. In addition, they have been detected in a variety of fermented products, edible oils (up to 6.5 mg/kg for sardine oil) (17), and bakery products such as bread or toast containing amounts of 0.3 and 0.79 mg/kg for GO and MGO, respectively (18).

Various chromatographic methods have been extensively described in the scientific literature for measuring GO and MGO, especially high-performance liquid chromatography (HPLC)-based procedures, capillary electrophoresis, and gas chromatography.

*Corresponding author (telephone +34 91 549 2300; fax +34 91 549 36 27; e-mail fjmorales@if.csic.es).

Derivatization of α -oxoaldehydes with diamino derivatives of benzene such as *o*-phenylenediamine (OPD) and conversion into corresponding quinoxaline derivatives with UV detection has been reported as allowing a more specific estimation of these compounds, especially if used in conjunction with HPLC (19, 20).

A number of studies have reported the formation of α -dicarbonyls resulting from carbohydrate and amino acid reaction during thermal treatment of foods, conditions that also favor acrylamide (AA) and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) formation. AA and HMF have been defined as heat-induced processing contaminants potentially harmful to humans (21, 22). Further studies on GO and MGO formation pathways are necessary because they may provide new information about the dynamics of these toxicants in food and, subsequently, potential mitigation strategies. Until now, knowledge of these reactive dicarbonyls in cookies, as well as their connection with acrylamide formation, has been limited, despite evidence indicating the important role they play in acrylamide genesis (23). Furthermore, GO and MGO levels in cookies have been poorly described so far.

These observations have stimulated our interest in investigating reactive dicarbonyl formation with respect to the formation of new processing contaminants. With this in mind, an in-house validated HPLC-UV method for the determination of GO and MGO in cookies has been developed. Additionally, their relationship with AA and HMF was also studied to get further insight into their formation dynamics and finally an estimation of exposure from cookies to these dicarbonyls.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. HPLC grade methanol was purchased from LabScan (Dublin, Ireland). Acrylamide (99%), 5-hydroxymethylfurfural, GO and MGO solutions (40% in water w/v), OPD, quinoxaline (Q), 2-methylquinoxaline (2-MQ), and 5-methylquinoxaline (5-MQ) were supplied by Sigma (St. Louis, MO). Sodium dihydrogen phosphate monohydrate and glacial acetic acid as well as formic acid were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). The following materials were also used: ultrapure water (Milli-Q system, Millipore Bedford, MA), Oasis-HLB cartridges (30 mg, 1 mL) and Oasis-MCX (30 mg, 1 mL) supplied by Waters (Milford, MA), Strata-X-C (30 mg, 1 mL) obtained from Phenomenex (Torrance, CA), and ($^{13}\text{C}_3$)-acrylamide (isotopic purity = 99%) from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). All other chemicals and reagents were of analytical grade.

Cookie Samples. Twenty-six commercial cookies were purchased from Spanish markets. To study the effect of the baking process on the dicarbonyls, laboratory-scale experiments were carried out with model cookies. The recipe was prepared according to that of Arribas-Lorenzo et al. (24) with some minor modifications: 85 g of wheat flour, 1 g of salt, 25 g of deionized water, 24 g of sunflower oil, 1.2 g of sodium bicarbonate, and 35 g of sugar. The dough was rolled to form disks with a diameter of 5 cm and a thickness of 2 mm and baked at 190 °C from 9 to 17 min. Samples were prepared in two parallel series and baked in an oven without forced air circulation (UNE 400, Memmert GmbH, Schwabach, Germany). Temperature was digitally controlled and monitored by software (Celsius 2007 v8.0, Memmert GmbH). All samples were finely ground and kept at 4 °C until analyses.

Determination of GO and MGO in Cookies. Samples of 0.5 ± 0.01 g were weighed into centrifuge tubes, and 5 mL of a mixture containing 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and methanol (50:50, v/v) was added. The cookies were spiked with certain amounts of 5-MQ (internal standard). Samples were vigorously shaken for 1 min and centrifuged (5000g for 10 min) at 4 °C. A 200 μL aliquot of supernatant was mixed with 375 μL of sodium phosphate buffer and 200 μL of OPD (10 mM) and incubated for 3 h at 65–70 °C in an oven (model 235, J. P. Selecta, Barcelona, Spain). After cooling, 200 μL of acetic acid was added to the derivatized mixture. The sample was then loaded onto the solid phase extraction (SPE) column (Oasis-HLB) (the SPE step had previously been optimized, see Results and Discussion), and eluent was discharged. Next, 1 mL of a mixture of methanol/0.5% acetic acid (40:60, v/v) and eluent was

discharged. Finally, 1 mL of methanol was passed through the cartridge and the eluent collected in an Amberlite vial. The analysis was carried out at least in duplicate.

Analytical HPLC-UV Procedure for Quantification of GO and MGO. GO and MGO were measured as the corresponding quinoxalines Q and 2-MQ, respectively, after derivatization with OPD using a reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure coupled to UV detection at 315 nm. A Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with an LC-20AD pump, an LC-20AD/AT low-pressure gradient former, an SIL-10ADvp autosampler, a CTO-10AS VP oven, and a DAD detector (SPD-M20A) was used. Separations were carried out on an ACE C18 column (5 μm , 250 \times 4.6 mm, Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, U.K.). Elution was performed isocratically with a mixture of 0.5% (v/v) acetic acid in water and methanol (40:60, v/v) with a detection of 315 nm, although UV spectra were recorded in the 190–340 nm range. Quantification was based on the peak area of each compound divided by the peak area of the internal standard in samples versus those found in the calibration standard. Standard stock solutions of Q and 2-MQ were prepared in deionized water to a concentration of 4 mg/mL. The solution was stored in the dark at 4 °C and used within 2 weeks. The standard working solution was obtained by subsequent dilution of the above-mentioned standard stock solutions with 0.5% (v/v) acetic acid in water and methanol (40:60, v/v) to yield concentrations of 0.01, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2, 0.4, 0.6, and 0.8 $\mu\text{g/mL}$.

Acrylamide Analysis. AA analysis was carried out by HPLC-MS according to the method of Arribas-Lorenzo et al. (24).

HMF Analysis. HMF determination was performed by reversed-phase HPLC according to the method of Rufián-Henares et al. (25).

Food Consumption Data. An exposure study was carried out by the Spanish Ministry of Agriculture, Fishing and Food based on a yearly food consumption database (26). The statistical universe of the study compiles a balanced, representative, and stratified probability sample of the Spanish population taking into account, gender, age, region, and socioeconomic status, among other factors. An average body weight of 70 kg was used to estimate the total daily intake of GO and MGO to total population expressed as micrograms per kilogram of body weight per day.

Statistical Analysis. Data are expressed as the mean of two or more independent determinations. Differences with $P < 0.05$ were considered to be statistically significant using the Tukey test. A Microcal Origin program version 7.5 (Origin Lab Corp., Northampton, MA) was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Derivatization. The derivatization procedure was based on a previous work (20) but with some modifications to accommodate the cookie samples. In a first step, standard solutions of target dicarbonyl compounds (GO and MGO) were used to verify the derivatization process. These standards were prepared at the same concentrations as the standard solutions of their respective quinoxalines (Q and 2-MQ), spiked with 5-MQ, and derivatized and quantified by HPLC-UV. OPD was used to derivatize GO and MGO into stable quinoxaline and 2-methylquinoxaline, respectively, and its concentration was similar to that reported on previous occasions (27). The reaction yield was determined by comparing the calibration curve data of GO versus Q and MGO versus 2-MQ with no significant differences being found ($P < 0.05$). Results showed that both curves were similar in the concentration range studied from 0.01 to 0.8 $\mu\text{g/mL}$.

Liquid Chromatography Separation. The separation of Q, 2-MQ, and 5-MQ (internal standard) was optimized by testing two analytical columns (Kromasil ODS-2, 5 μm , 250 mm \times 4.0 mm, and ACE C18, 5 μm , 250 \times 4.6 mm). The ACE column produced better resolution and appearance of peak shapes despite having a longer retention time for GO and MGO (data not shown). The influence of the solvent was also investigated by comparing methanol and acetonitrile in combination with a water solution of acetic acid (0.5%) under isocratic conditions at different percentages. The best separation was obtained with 60% methanol and 40% water acidified with 0.5% acetic acid and a flow of

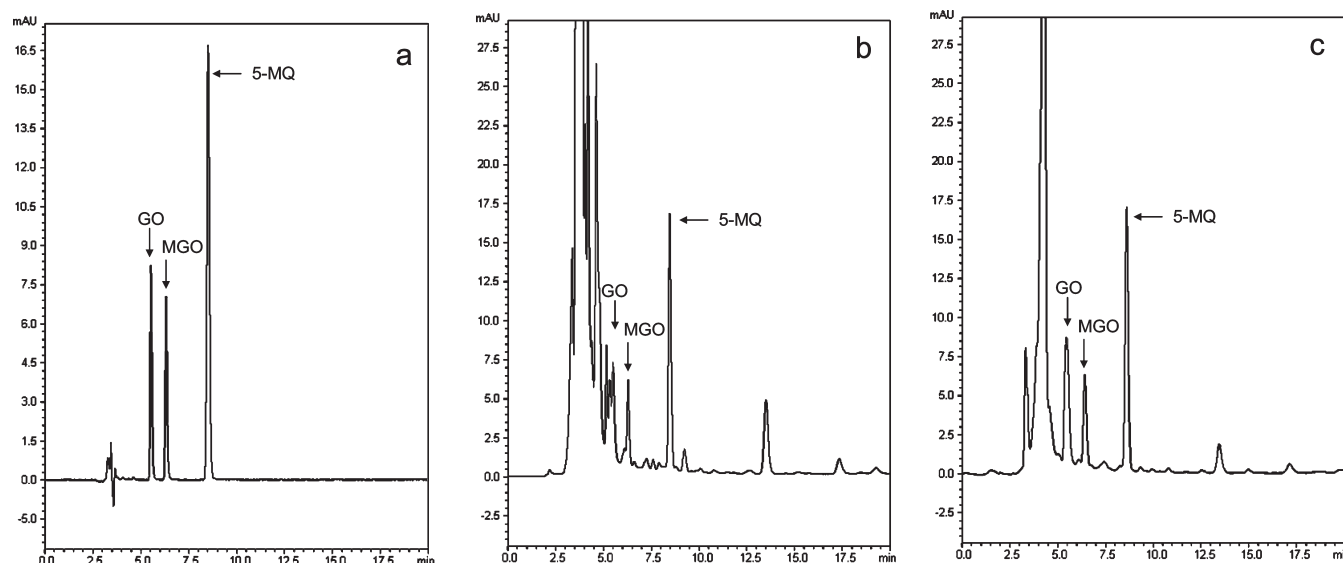


Figure 1. Chromatograms of quinoxaline derivatives of glyoxal (GO) and methylglyoxal (MGO) and internal standard of 5-methylquinoxaline (5-MQ) detected at 315 nm: standard solutions (a); cookie sample before cleanup step (b); cookie sample after cleanup step (c).

0.8 mL/min. **Figure 1a** shows a chromatogram of Q and 2-MQ standard solutions at a concentration of 0.8 $\mu\text{g/mL}$ each, along with 2.78 $\mu\text{g/mL}$ of the internal standard 5-MQ under the described optimum conditions. Retention times were 5.1, 6.1, and 8.4 min for Q, 2-MQ, and 5-MQ, respectively.

Optimization of the Extraction Conditions. The effect of the sample amount in the extraction step was evaluated at two sample/extraction solvent ratios of 1:5 and 1:10 (g/mL). Methanol was chosen as an efficient solvent to extract these carbonyl compounds as indicated in previous studies (13). The study was assayed in spiked cookie samples with a known amount of GO and MGO to evaluate the yield. At the same time, the effect of different percentages of mixture solvents (30 and 50%, v/v; methanol in sodium phosphate buffer (pH 7.4)) was also studied. Extraction efficiency improved with a sample/extraction ratio of 1:10 (g/mL) and 50% (v/v) methanol (data not shown). Therefore, dicarbonyl extraction from cookie samples was carried out under these conditions.

Analytes were poorly resolved when the former procedure was directly applied to cookies as shown in **Figure 1b**. To eliminate interferences and to obtain a cleaner chromatogram and consequently increased sensitivity, the SPE procedure was carried out as a cleanup step. This purification step had previously been employed for both biological and food samples (28, 29). Three different SPE cartridges were tested (Oasis-HLB, Oasis-MCX, Strata-X-C). These cartridges were evaluated under conditions recommended by each respective supplier using as an internal reference both an unspiked cookie sample and one spiked with Q and 2-MQ. In addition, standard solutions of Q, 2-MQ, and 5-MQ with increasing percentages of methanol (0, 20, 40, 60, 80, and 100%) in acetic acid (0.5%) were also evaluated. Recovery, retention time, separation at baseline, and cleanness of the chromatogram profile were likewise assessed. Q, 2-MQ, and 5-MQ standards were effectively retained by the three cartridges, each reporting similar recoveries. However, differences in the chromatographic profile were observed when a cookie sample was used. The Oasis-HLB cartridge provided the best chromatographic separation and resolution for cookies with no interferences when the extract was finally eluted with 100% methanol. Panels **b** and **c** of **Figure 1** show the chromatograms obtained for a cookie sample before and after the cleanup step. Recovery in the cleanup step was also studied using GO and MGO standard

Table 1. Calibration Data (Correlation Coefficient, r , and Regression Equation), Limits of Detection (LOD), and Limits of Quantification (LOQ) for Analysis of Dicarbonyl Compounds in Cookies^a

compound	calibration data			LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
	r	equation			
glyoxal	0.999	$330.67x + 3.76$		0.01	0.03
methylglyoxal	0.997	$367.72x + 0.76$		0.02	0.04

^a Concentration range applied from 0.01 to 0.8 $\mu\text{g/mL}$.

solutions to which the internal standard had been added before derivatization with OPD, followed by RP-HPLC analysis before being finally passed through the cartridges. Recovery by the SPE was checked by comparing the ratio area peaks of Q or 2-MQ/ 5-MQ obtained by analyzing directly the derivatized compounds prior to SPE with the same standard solutions derivatized after SPE. The recovery average obtained ranged from 90 to 106%.

Although the dicarbonyls studied can be separated with good resolution within 9 min, it was necessary to increase the elution time to allow for the elution of other peaks that could interfere in the next injection. Chromatographic separation of dicarbonyls in cookies is complex due to the likely presence of other compounds, apart from GO and MGO, such as deoxysones (i.e., 3-deoxyglucosone), but they are not the subject of the present investigation.

Method Validation. *Linearity.* The linearity of the chromatographic method was calculated using Q and 2-MQ standard solutions ranging from 0.01 to 0.8 $\mu\text{g/mL}$ and with the internal standard at 2.78 $\mu\text{g/mL}$. The response of both compounds was satisfactory with correlation coefficients >0.997 . Appropriate dilution was applied to sample extracts $>0.8 \mu\text{g/mL}$. **Table 1** summarizes the calibration data for GO and MGO.

Repeatability and Reproducibility. The repeatability and reproducibility were determined by replicate analyses of a cookie sample. The precision values are presented in **Table 2** as well as the concentrations of GO and MGO in the sample. The assay was performed using relative standard deviation (RSD, %) and calculated by analyzing five replicates over a period of 3 days. The results obtained for both dicarbonyls showed RSD of $<7\%$, indicating that the precision of the method was satisfactory.

Recovery. **Table 3** gives the recovery results obtained for GO and MGO. Accuracy was determined by measuring the percentage of recovery after spiking a cookie sample with three different

Table 2. Repeatability and Reproducibility Values of the HPLC-UV Procedure for Analysis of Glyoxal and Methylglyoxal in Cookies^a

compound	mean (mg/kg) \pm SD			RSD (%) repeatability	RSD (%) reproducibility
	day 1	day 2	day 3		
glyoxal	15.4 \pm 0.9	16.5 \pm 0.8	16.7 \pm 1.1	5.8	4.3
methylglyoxal	51.8 \pm 3.1	55.7 \pm 2.8	58.3 \pm 4.8	6.4	5.9

^a The assay was carried out on three different days with five replicates each. SD, standard deviation; RSD, relative standard deviation.

Table 3. Recovery (Mean \pm RSD) of the Dicarbonyls from a Cookie Sample at Different Spiking Levels ($n = 5$)

compound	recovery (%) at spiking level of		
	0.08 μ g/mL	0.4 μ g/mL	0.8 μ g/mL
glyoxal	102 \pm 7	107 \pm 3	114 \pm 2
methylglyoxal	99 \pm 2	97 \pm 4	103 \pm 4

levels of GO and MGO standard solutions and 25 μ L of the internal standard prior to the derivatization process. The recovery obtained for both compounds ranged from 97 to 114% with RSDs of < 8% at different spiking levels.

Limits of Detection (LOD) and Quantification (LOQ). The LOD and LOQ were determined by calculating the standard deviation of the area divided by the slope and multiplying by 3.33 and 10, respectively. **Table 1** summarizes the LOD and LOQ obtained, although lower detection limits could easily be achieved if needed by applying a preconcentration step after cleanup.

Application to Commercial Cookies. The in-house validated method was applied in the analysis of 26 commercial cookies taken randomly from different local markets in Madrid (Spain) to obtain information on the distribution of these dicarbonyls and then to estimate population exposure to them. As cookies comprise a heterogeneous food commodity group because they are composed of a great variety of ingredients (**Table 4**), traditional sweets, breakfast, and dietetic cookies were also included in this study. **Table 5** summarizes the results obtained from the samples. GO content ranged from 4.8 to 26.0 mg/kg with a mean value of 15.0 mg/kg and a median of 16.4 mg/kg. MGO content ranged from 3.7 to 81.4 mg/kg with a mean value of 29.9 mg/kg and a median of 16.6 mg/kg.

So far, numerous studies have found these dicarbonyls in foodstuffs such as beer, honey, butter, wine, and fermented foods, products in which these compounds were most frequently detected. However, published data on bakery products is scarce, so a systematic study is necessary before any risk assessment can be carried out. GO and MGO were detected at concentrations of 0.3 and 0.79 mg/kg, respectively, in bread, and in the case of toast the amounts reported were 0.5 and 2.5 mg/kg for GO and MGO (18). Roiter and Borovikova (30) also showed that bread crust and bread crumbs contained GO at concentrations of up to 1.6 mg/kg. However, no studies have been found on the detection of these dicarbonyls in cookies. The GO and MGO levels in cookies found in our work were about 10-fold higher than those obtained for bakery products and could result from differences in the formulation and processing of the cookies and bread. In general, cookie formulation is more complex and contains ingredients such as reducing sugars and probably unsaturated oils, which are precursors of these dicarbonyls through the Maillard reaction, caramelization, or lipid oxidation. It is known that MGO is formed by retroaldolization of the intermediate 3-deoxyglucosulose (31) and that GO is mainly a product of autoxidation of glucose (32). In comparison, bread derivatives are mainly made up

Table 4. Ingredients of Commercial Cookies^a

cookie	sugars	cereal	NH ₄ HCO ₃
1	sucrose, syrup	W	
2	sucrose, glucose syrup	O	yes
3	sucrose, glucose syrup	W	
4	sucrose, glucose syrup	W	
5	fructose	W, R, Z, Y	yes
6	sugar, honey	W	
7	sucrose	W	
8	sucrose, glucose	W, R	
9	sucrose, glucose syrup, caramel	W	
10	sucrose, glucose, fructose syrup	W	
11	sucrose, glucose syrup	W	
12	sucrose, glucose, fructose syrup	W	
13	fructose	W	yes
14	sucrose, glucose syrup	W	
15	fructose	W	yes
16	maltitol, lactitol, caramel	W	
17	sucrose, glucose syrup	W, R, M	
18	sucrose, glucose, fructose syrup	W, O	
19	sucrose, glucose, fructose syrup, honey	W, O, Y	
20	sucrose, glucose, fructose syrup, honey	W, O	
21	fructose	W	yes
22	fructose	W, O	yes
23	fructose	W	
24	fructose	W, R, Z, Y	yes
25	sucrose, glucose syrup	W	
26	sucrose, glucose syrup, honey	W	

^a Wheat (W), oat (O), maize (Z), rice (R), malt (M), and rye (Y).

Table 5. Occurrence of Glyoxal and Methylglyoxal in Commercial Cookies

	glyoxal (mg/kg)	methylglyoxal (mg/kg)
mean	15.0	29.9
standard deviation	5.2	25.9
minimum	4.8	3.7
25th percentile	11.4	12.1
median	16.4	16.6
75th percentile	18.7	46.6
95th percentile	26.0	81.4
maximum	20.5	78.0

of wheat flour, baking powder, salt, and water, so dicarbonyl levels would be expected to be lower.

By a closer scrutinization of the data it can be seen that seven cookie samples showed higher values in comparison with the rest, all of them with MGO values above 52.2 mg/kg and up to 81.4 mg/kg. It was observed that cookies containing ammonium bicarbonate and fructose as ingredients (**Table 4**) formed more MGO, thus confirming that ammonium bicarbonate and fructose facilitate the generation of these dicarbonyl compounds (23).

To estimate the dietary exposure of Spanish consumers to dicarbonyls from cookies, the national tables of food consumption for 2008 were used (26). Although the point estimate (deterministic approach) does not assess the probability or uncertainty or even identify high-risk consumers, because it is based on population and not on subjects, it is nevertheless a first approximation and a useful screening tool for designing a more specific study should there be a potential risk. Overall population exposures to dicarbonyls from cookies were estimated to be 213 and 216 μ g/person/day for GO and MGO, respectively.

Mapping of Dicarbonyl Distribution in Commercial Cookies. Six independent samples with different shapes, thicknesses, and apparently different baking technologies according to their brownness (visual appreciation) were chosen to get a broad view of the distribution of GO and MGO in different zones of the

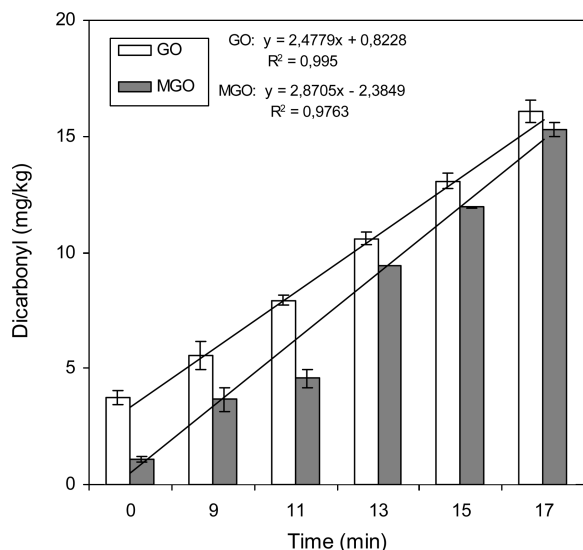


Figure 2. Influence of baking time (min) on formation of glyoxal (GO) and methylglyoxal (MGO) in cookies prepared at laboratory scale at 190 °C.

cookie. Representative portions of the upper side (US), lower side (LS), center side (CS), and border side (BS) of the sample cookie were obtained to map the contribution of each fraction to that of the whole cookie. On average, GO and MGO formations were significantly higher in US and BS portions as expected, regardless of the shape or thickness of the cookie, because water evaporation and temperature are higher in these parts of the cookie, subsequently enhancing both caramelization and the Maillard reaction. Furthermore, considerable variability was observed due to sample heterogeneity because there could be up to a 3-fold difference in GO content between the upper and lower sides in some samples. These results clearly showed that GO and MGO contents in cookies were not uniformly distributed.

Effect of Processing Conditions. The influence of baking conditions on GO and MGO in cookies baked at 190 °C for 9, 11, 13, 15, and 17 min was investigated. As shown in **Figure 2**, amounts of both GO and MGO increased linearly with time, reaching up to 16.1 and 15.3 mg/kg for GO and MGO, respectively. Values were higher for GO than for MGO, probably due to its formation by sugar oxidation during the heating process, unlike MGO which is enhanced by the Maillard reaction (32). In general, levels were found to be lower than those detected in commercial samples, possibly due not only to the different baking processes but also again to the type of sugar used in the formulation be it syrup, inverted sugar, or honey. Cookies were prepared in the laboratory with sucrose as the only sugar ingredient because earlier experiments had demonstrated that the use of a nonreducing sugar such as sucrose formed less dicarbonyls than it would if used in conjunction with glucose or fructose (23). Apart from the foregoing, these reactive compounds can undergo multiple reactions and form other compounds such as melanoidins at more advanced stages of the reaction (see, e.g., ref 33). Nevertheless, despite the small amounts detected, it was clear that the baking process markedly accelerated the formation of these compounds, confirming previous data such as that of Daglia et al. (29), who demonstrated that the content of α -dicarbonyl compounds was influenced by the roasting process of coffee. Moreover, it was observed that dicarbonyls had already been detected in dough before fermentation, indicating that the dough fermentation process may have started when the baking agent was added because it has been reported that both dicarbonyls are formed in fermented food (13).

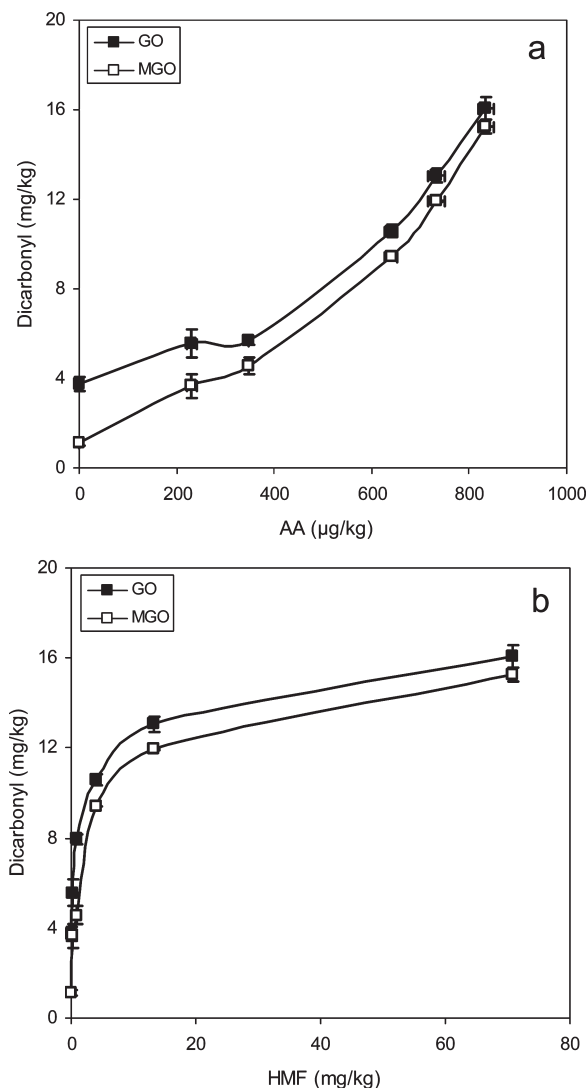


Figure 3. Relationship between dicarbonyls and acrylamide (a) and HMF (b) levels in cookies baked at 190 °C for different times. AA, acrylamide; GO, glyoxal; MGO, methylglyoxal.

Relationship with Acrylamide and HMF. Acrylamide has been identified by many as a heat-induced toxicant in foodstuffs, formed by the reaction between a reducing sugar and asparagine in the Maillard reaction (34, 35). Its formation is greatly facilitated by high temperatures (above 120 °C) in processes such as frying, baking, or roasting (36). To date, several studies have demonstrated the role of α -dicarbonyl compounds in the formation of acrylamide following the Strecker degradation pathway (23, 34). Recently, Yuan et al. (37) showed clearly that MGO is the reaction precursor of acrylamide and accounts for nearly 80% of its formation in aqueous Maillard reaction models (Glc/Asn).

In our study, former correlation with model systems was also demonstrated in cookies prepared at laboratory scale and in commercial samples as well. **Figure 3a** shows acrylamide content and dicarbonyl levels of cookies at laboratory scale at different baking times. The yield of acrylamide and dicarbonyls was positively correlated during baking under controlled conditions. These results for cookies are also in line with the literature, in which it has been reported that these reactive intermediates of the Maillard reaction interact with asparagine, forming acrylamide in model systems (34). As described in model systems (37), formation of dicarbonyls, as precursors of AA, accumulates during the first stages of baking until AA formation is observed.

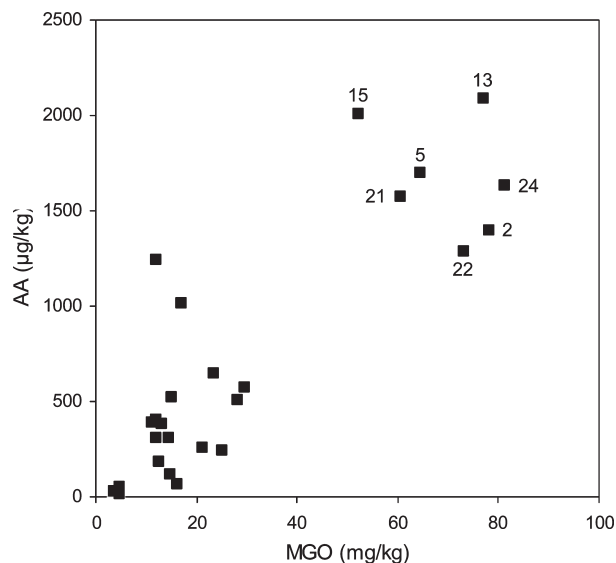


Figure 4. Relationship between methylglyoxal (MGO) and acrylamide (AA) in commercial cookies. Numbers correspond to cookie samples identified in Table 4.

Figure 4 registers the levels of MGO and acrylamide in commercial cookies. Seven cookie samples show substantially higher amounts of MGO (from 52.2 to 81.4 mg/kg) and acrylamide (from 1200 to 2100 $\mu\text{g/kg}$) in comparison with the rest of the samples that contain up to 29.7 mg/kg for MGO and 1200 $\mu\text{g/kg}$ for AA. This difference might be the result of sample variability produced not only by the choice of baking processes but also by recipe variations. However, if cookie composition (Table 4) is observed, results show that the lowest levels of MGO and acrylamide are found in those cookies which contain ingredients such as sucrose, glucose, or sodium bicarbonate. Cookies with the highest levels were those elaborated especially with ammonium bicarbonate or fructose instead of glucose or sodium bicarbonate. This replacement gave rise to an increase in acrylamide and MGO levels. Similar behavior has been described in model systems in other published work. Amrein et al. (23) demonstrated that the baking agent ammonium bicarbonate promoted the formation of more dicarbonyl compounds compared with sodium bicarbonate and even more in the presence of fructose. Thus, it is important to stress that this finding confirmed that acrylamide formation is related to these reactive intermediates in real samples. However, no correlation was observed between GO and AA levels in commercial cookies because GO, unlike AA, is not the predominant α -dicarbonyl fragment formed by the Maillard reaction. Carbohydrate fragmentation is enhanced by alkaline conditions and subsequently, by the formation of sugar fragments with an α -dicarbonyl moiety. Therefore, it is reasonable to find higher levels of MGO and GO in commercial samples with ammonium bicarbonate as the leavening agent.

With regard to HMF, it is formed either in the Maillard reaction or by caramelization, but significantly HMF did not correlate with either GO or MGO in commercial cookies (data not shown), in contrast to acrylamide. However, in cookies prepared at laboratory scale at different times, a correlation was observed (Figure 3b). At the beginning, HMF and dicarbonyl amounts were basically low, indicating that an induction period was necessary to form these compounds. However, after 15 min of baking time, a large increase in HMF formation was observed, whereas dicarbonyl compounds only increased slightly. This revealed that HMF formation was highly dependent on temperature in contrast to dicarbonyls that were formed in previous stages

of the reaction. Furthermore, similar behavior was observed in both dicarbonyls. GO and MGO formation can result from isomerization and subsequent retro-aldolization of sugar or by cleavage or 3-deoxyhexulose (11), but MGO is formed to a larger extent under MR conditions, especially through degradation of the Amadori product more than during caramelization.

In conclusion, analysis of GO and MGO in foods is difficult because they are very reactive, easily polymerized, and volatile substances. The in-house validated RP-HPLC-UV method described in this paper permitted the determination of GO and MGO levels in cookies after derivatization to stable quinoxaline derivatives and a cleanup step. GO and MGO were widely distributed in commercial cookies in a broad range of concentrations but mostly present at the surface of the cookie. Because GO and MGO may be involved in the early stages of many age-related human diseases (4, 5), it is of relevance to evaluate their dietary exposure. Under controlled baking conditions, formation of dicarbonyl compounds was related to the baking time and, subsequently, to the formation of both acrylamide and HMF. Finally, this study revealed for the first time that there is a significant correlation between MGO and acrylamide in commercial cookie samples, thus confirming the important role of dicarbonyls in the formation of these heat-induced contaminants in foods.

ACKNOWLEDGMENT

Silvia de la Peña and M. A. Martínez are gratefully acknowledged for their technical assistance.

LITERATURE CITED

- Thornalley, P. J. Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2005**, *1043*, 111–117.
- Talukdar, D.; Chaudhuri, B. S.; Ray, M.; Ray, S. Critical evaluation of toxic versus beneficial effects of methylglyoxal. *Biochemistry (Moscow)*, **2009**, *74*, 1059–1069.
- Lapolla, A.; Flamini, R.; Lupo, A.; Arico, N. C.; Rugiu, C.; Reitano, R.; Tubaro, M.; Ragazzi, E.; Seraglia, R.; Traldi, P. Evaluation of glyoxal and methylglyoxal in uremic patients under peritoneal dialysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2005**, *1043*, 217–224.
- Thornalley, P. J. Glycation free adduct accumulation in renal disease: the new AGE. *Pediatr. Nephrol.* **2005**, *20*, 1515–1522.
- Kalapos, M. P. Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol. Lett.* **1999**, *110*, 145–175.
- Baskaran, S.; Balasubramanian, K. A. Toxicity of methylglyoxal towards rat enterocytes and colonocytes. *Biochem. Int.* **1990**, *21*, 165–174.
- Ueno, H.; Nakamuro, K.; Sayato, Y.; Okada, S. DNA lesion in rat hepatocytes induced by in vitro and in vivo exposure to glyoxal. *Mutat. Res.* **1991**, *260*, 115–119.
- Schnuch, A.; Uter, W.; Geier, J.; Frosch, P. J.; Rustemeyer, T. Contact allergies in healthcare workers. Results from the IVDK. *Acta Derm. Venereol.* **1998**, *78*, 358–363.
- Uter, W.; Schwanitz, H. J.; Lessmann, H.; Schnuch, A. Glyoxal is an important allergen for (medical care) cleaning staff. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2001**, *204*, 251–253.
- Nemet, I.; Varga-Defterdarovic, L.; Turk, Z. Methylglyoxal in food and living organisms. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 115–117.
- Homoki-Farkas, P.; Örsi, F.; Kroh, L. W. Methylglyoxal determination from different carbohydrates during heat processing. *Food Chem.* **1997**, *59*, 157–163.
- Niyati-Shirkhodae, F.; Shibamoto, T. Gas-chromatographic analysis of glyoxal and methylglyoxal formed from lipids and related-compounds upon ultraviolet-irradiation. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 227–230.
- Yamaguchi, M.; Ishida, J.; Xuan-Xuan, Z.; Nakamura, M.; Yoshitake, T. Determination of glyoxal, methylglyoxal, diacetyl,

- and 2,3-pentanedione in fermented foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr.* **1994**, *17*, 203–211.
- (14) Weigel, K. U.; Opitz, T.; Henle, T. Studies on the occurrence and formation of 1,2-dicarbonyls in honey. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *218*, 147–157.
- (15) De Revel, G.; Bertrand, A. A method for the detection of carbonyl compounds in wine: glyoxal and methylglyoxal. *J. Sci. Food Agric* **1993**, *61*, 267–272.
- (16) Barros, A.; Rodrigues, J. A.; Almeida, P. J.; Oliva-Teles, M. T. Determination of glyoxal, methylglyoxal and diacetyl in selected beer and wine by HPLC with UV spectrophotometric detection after derivatization with *o*-phenylenediamine. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1999**, *22*, 2061–2069.
- (17) Hirayama, T.; Yamada, N.; Nohara, M.; Fukui, S. The existence of the 1,2-diacarbonyl compounds glyoxal, methylglyoxal and diacetyl in autoxidised oils. *J. Sci. Food Agric.* **1984**, *35*, 1357–1362.
- (18) Nagao, M.; Fujita, Y.; Sugimura, T.; Kosuge, T. Methylglyoxal in beverages and foods: its mutagenicity and carcinogenicity. *IARC Sci. Publ.* **1986**, *70*, 283–291.
- (19) Thornalley, P. J.; Langborg, A.; Minhas, H. S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* **1999**, *344*, 109–116.
- (20) De Revel, G.; Pripis-Nicolau, L.; Berbe, J. C.; Bertrand, A. The detection of α -dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 102–108.
- (21) *Acrylamide*; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 1994.
- (22) Surh, Y.; Tannenbaum, S. Activation of the Maillard reaction product 5-(hydroxymethyl)furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination. *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7*, 313–318.
- (23) Amrein, T. M.; Andres, L.; Manzardo, G. G. G.; Amado, R. Investigations on the promoting effect of ammonium hydrogencarbonate on the formation of acrylamide in model system. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 10253–10261.
- (24) Arribas-Lorenzo, G.; Fogliano, V.; Morales, F. J. Acrylamide formation in a cookie system as influenced by the oil phenol profile and degree of oxidation. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *229*, 63–72.
- (25) Rufián-Henares, J. A.; Delgado-Andrade, C.; Morales, F. J. Application of a fast HPLC method for simultaneously determination of furanic compounds and glucosylisomaltol in breakfast cereals. *J. AOAC Int.* **2006**, *89*, 161–165.
- (26) MARM. *La Alimentación en España*; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: Madrid, Spain, 2009.
- (27) Dhar, A.; Desai, K.; Liu, J.; Wu, L. Methylglyoxal, protein binding and biological samples: are we getting the true measure? *J. Chromatogr., B* **2009**, *877*, 1093–1100.
- (28) Gildersleeve, D. L.; Tobes, M. C.; Natale, R. B. Rapid analysis for methylglyoxal bis(guanyldihydrazone) by reversed-phase ion-pair liquid chromatography. *Clin. Chem.* **1985**, *31*, 1979–1984.
- (29) Daglia, M.; Papetti, A.; Aceti, C.; Sordelli, B.; Spini, V.; Gazzani, G. Isolation and determination of α -dicarbonyl compounds by RP-HPLC-DAD in green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8877–8882.
- (30) Roiter, I. M.; Borovikova, L. A. Level of volatile carbonyl compounds in bread during the addition of enzyme preparations. *Khlebopek. Konditer. Promst.* **1972**, *14*, 14–15.
- (31) Weenen, H. Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry. *Food Chem.* **1998**, *62*, 393–401.
- (32) Wells-Knecht, K. J.; Zyzak, D. V.; Litchfield, J. E.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* **1995**, *34*, 3702–3709.
- (33) Hayashi, T.; Namiki, M. Role of sugar fragmentation in an early stage browning of amino-carbonyl reaction of sugar with amino acid. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 1965–1970.
- (34) Mottram, D. S.; Wedzicha, B. L.; Dodson, A. T. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* **2002**, *419*, 449–450.
- (35) Stadler, R. H.; Blank, I.; Varga, N.; Robert, F.; Hau, J.; Guy, P. A.; Robert, M. C.; Riediker, S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* **2002**, *419*, 449–450.
- (36) Tareke, E.; Rydberg, P.; Karlsson, P.; Eriksson, S.; Tornqvist, M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4998–5006.
- (37) Yuan, Y.; Zhao, G.-h.; Hu, X.-s.; Wu, J.-h.; Liu, J.; Chen, F. High correlation of methylglyoxal with acrylamide formation in glucose/asparagine Maillard reaction model. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *226*, 1301–1307.

Received for review August 12, 2009. Revised manuscript received January 12, 2010. Accepted January 22, 2010. This research has been partly funded under Project ANALYSIC (S-505/AGR-0312) by the Autonomous Community of Madrid and the Spanish Ministry of Science and Technology (AGL 2005-01735). G.A.-L. is grateful to the Conserjería de Educación de la Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo for her Ph.D. grant.

Capítulo 3

Estudios de inhibición

3.1. Efecto de la piridoxamina en la formación de acrilamida en un sistema modelo glucosa-asparagina de baja humedad

La piridoxamina es un derivado natural de la vitamina B₆ que ha demostrado poseer una excelente capacidad para inhibir la formación de AGEs *in vivo* e *in vitro* (Voziyan y col., 2002), siendo uno de sus principales mecanismos de acción el secuestro de intermedios dicarbonílicos como son, entre otros, el glioxal y el metilglioxal. Considerando entonces la relación existente entre los compuestos 1,2-dicarbonílicos y la acrilamida, confirmada en el capítulo anterior, el principal propósito de este trabajo es evaluar si este vitámero podría mitigar la formación de acrilamida.

Para ello se realizaron estudios cinéticos en condiciones de baja humedad a diferentes temperaturas y tiempos empleando glucosa y asparagina como reactantes. El análisis de acrilamida se llevó a cabo mediante HPLC-DAD y posteriormente mediante LC-MS. La determinación de glucosa se realizó por LC con detector de índice de refracción. La asparagina fue analizada, previa derivatización con orto-ftaldehído (OPA), en un lector de placas. Por último, la cuantificación de piridoxamina se realizó empleando LC con detector de fluorescencia.

La piridoxamina fue capaz de reducir los valores de acrilamida tanto en la etapa de formación como en las etapas finales de eliminación, llegando a ser más relevante a temperaturas superiores a 120 °C. También se observó que la piridoxamina no influyó de manera significativa en las tasas de consumo de la glucosa y la asparagina. A esta misma conclusión se llegó cuando se evaluó el grado de pardeamiento en los sistemas modelo, siendo el color desarrollado en el sistema casi dos veces menor en presencia de piridoxamina. La actividad de la piridoxamina frente a la inhibición selectiva de la formación de acrilamida fue superior en comparación con el piridoxal, la piridoxamina y la vitamina C.

El mecanismo de inhibición de la piridoxamina podría estar relacionado con los intermedios reactivos dicarbonílicos de la RM (glioxal, metilglioxal, 3-deoxiglucosona, etc.), ya que según se ha descrito en la bibliografía, debido a las características estructurales, la piridoxamina es capaz de participar en reacciones nucleófilas con estos reactivos y formar aductos, pudiendo inhibir de este modo los siguientes pasos de la ruta de formación de acrilamida. Además, este bloqueo también se observó a través del aumento del precursor 3-aminopropionamida.

Este artículo ha sido publicado en la revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry* con el título de ***“Effect of pyridoxamine on acrylamide formation in a glucose/asparagine model system”***.

Effect of Pyridoxamine on Acrylamide Formation in a Glucose/Asparagine Model System

GEMA ARRIBAS-LORENZO AND FRANCISCO J. MORALES*

Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (formerly Instituto del Frío), José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain

The effect of pyridoxamine (PM) on the reduction of acrylamide (AA) formation in a low-moisture equimolar glucose/asparagine model system was investigated. Formation/elimination kinetics of acrylamide was carried out at temperatures between 120 and 180 °C. Time courses of glucose, asparagine, pyridoxamine, 3-aminopropionamide (3-APA), acrylamide, and browning were measured to get more insight on the mechanism of action of PM. PM exhibited an inhibitory effect on AA formation at all temperatures studied, but became more relevant at 160 and 180 °C (up to 51% reduction). Degradation rates of glucose and asparagine were not significantly affected by PM, but PM was rapidly consumed in the glucose/asparagine system. Browning was significantly suppressed by addition of PM in the system, and formation of 3-APA was increased as compared to control. In comparison with pyridoxal, pyridoxine, and ascorbic acid, PM exerted the highest inhibition activity against AA formation, and a clear dose–response was observed. The nucleophilic aminomethyl group of PM was crucial for the exertion of an inhibition effect more than double those other B6 vitamers. The action mechanism of PM was attributable to its structural features that have the capacity to scavenge intermediary dicarbonyls formed during sugar degradation and advanced stages of the Maillard reaction. These findings open new possibilities for strategies in acrylamide mitigation where formation of reactive dicarbonyls should be carefully considered.

KEYWORDS: Acrylamide; pyridoxamine; Maillard reaction; glucose; asparagine; color; 3-aminopropionamide

INTRODUCTION

Acrylamide (AA) is naturally formed mainly in carbohydrate-rich foods during thermal treatment such as frying, baking, or roasting, and it is largely present in the diet of western countries. Levels of AA in foods suggest potential safety issues relative to its potent mutagenicity and carcinogenicity as well as its damages to the central nervous system functions. Thus, the presence of this heat-induced toxicant in foodstuffs has led to public health concern, and intense research is being focused on ways of preventing or minimizing its formation (1, 2).

Since 2002, significant efforts have been conducted to elucidate the chemistry pathways of AA for which the main actors have been identified. Thermal degradation of free asparagine in the presence of reducing sugars or carbonyls following Maillard-type reactions has been proposed as the major route in acrylamide formation (3, 4). It is known that Schiff bases, decarboxylated Amadori compounds, Strecker aldehydes, and glycoconjugates such as *N*-glycosides contribute to the formation of AA (3–5), via Maillard reaction (MR). Therefore, yields of AA can be reduced by competitive reactions with these key intermediates, suppressing the early steps of the

MR. In this way, for instance, it was shown that metal ions inhibited acrylamide formation by impeding the intermediate Schiff base of asparagine, or ferulic acid, from reacting with AA precursors or intermediates; alternative approaches involve adding amino acids that compete with asparagine in the MR such as glycine, reduction by olive oil phenolic compounds, and the addition of bamboo leaves or green tea extracts. Recently, Friedman and Levin (2) published a comprehensive review of the different strategies of mitigation applied.

Vitamin B₆ is a water-soluble vitamin that exists in three major chemical forms: pyridoxine (PN), pyridoxal (PL), and pyridoxamine (PM). The phosphate ester derivative pyridoxal 5'-phosphate (PLP) is the principal coenzyme form and has the most importance in human amino acid and protein metabolism and red blood cell metabolism; it is mainly present in fruits, vegetables, cereal grains, meat, poultry, and fish (6).

In recent years, PM has attracted increasing attention because it is a pharmacological agent used for the treatment of multifactorial chronic diseases, such as diabetes or atherosclerosis complications, by inhibiting the MR and reducing the pathogenicity of carbonyl compounds (7). PM also prevents renal and vascular pathology and hyperlipidemia in the Zucker obese nondiabetic rat model (8). In addition, as recently reviewed by Friedman and Levin (2), it has been pointed out

* Corresponding author (telephone +34 91 549 23 00; fax +34 91 549 36 27; e-mail fjmorales@if.csic.es).

that PM might be a possible inhibitor of AA in food, so investigations should be conducted to clarify this point.

Furthermore, PM has been described as a post-Amadori inhibitor capable of inhibiting the formation of advanced glycation end-products (AGEs) in vivo and in vitro (9, 10) as well as advanced lipoxidation end-product (ALEs) (10, 11), but its reaction mechanisms are yet subject to debate. Its inhibition properties involved in the MR are a consequence of its reactivity due to the phenol and aminomethyl group at pyridinium ring, respectively. In addition, there has been a previous study demonstrating that vitamin B₆ supplementation can delay and reduce the severity of the neurotoxicity caused by acrylamide (12).

Previous knowledge supports the idea that PM could act as an inhibitor of AA formation in foods. Its demonstrated inhibitory effects in vivo have not been studied in foods so far. The main purpose of this investigation was, therefore, to evaluate whether this natural intermediate of vitamin B₆ capable of inhibiting AGE formation could mitigate AA formation in foods systems as well. Another objective was to gain information about the action mechanism of PM on reactions that involve acrylamide formation. The inhibition rates of PM were compared with those of PN and PL as well as vitamin C as reference. In the present paper the main changes in glucose, asparagine, and 3-aminopropionamide (3-APA) and the extent of browning as well as the changes in the PM, subjected to rate of disappearance or destruction due to a heating process, were considered.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Acrylamide (99%), D-(+)-glucose, dansyl chloride (5-[dimethylamino]naphthalene-1-sulfonyl chloride), pyridoxine hydrochloride, pyridoxal hydrochloride, and *o*-phthalaldehyde (OPA) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Heptafluorobutyric acid and pyridoxamine dihydrochloride were from Fluka Chemicals (Madrid, Spain). L-Asparagine monohydrate, glycine, β -mercaptoethanol, methanol, and acetonitrile (HPLC grade) were bought from Merck (Darmstadt, Germany). Boric acid, sulfuric acid (96%), formic acid (98%), sodium phosphate monobasic, and sodium bicarbonate were from Panreac (Madrid, Spain). β -Alaninamide hydrochloride (97%) was from ABCR GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany). Ultrapure water was used (Milli-Q system, Millipore Bedford, MA). Oasis-HLB cartridges (30 mg, 1 mL) were supplied by Waters (Milford, MA). [¹³C₃]Acrylamide (isotopic purity 99%) was from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). Glass vials with septum screw caps were supplied by Agilent Technologies (Wilmington, DE).

Preparation of Model Systems. *Kinetic Model.* (a) *Glucose and Asparagine (Glc/Asn).* Reaction mixtures were prepared with equimolar quantities (1:1) of Glc and Asn (0.3 mmol each). To obtain a homogeneous mixture, both reactants were carefully dry-mixed in a mortar until a powder was obtained. Aliquots of the mixtures (99.1 mg) were transferred to Pyrex hydrolysis tubes (10 cm \times 0.9 mm i.d.) with 100 μ L of 0.1 M NaH₂PO₄ buffer (pH 6.8), tightly capped, and heated in an oil bath at temperatures of 120, 140, 160, and 180 °C for various times. Temperature (reference temperature \pm 1 °C) was previously calibrated, with external thermocouples (type K, 0.1 mm) coupled to a datalogger. The heated samples were cooled immediately in iced water to stop any further reaction. Samples were kept at 4 °C for analysis within the same working day or frozen for further analysis. Experiments were prepared at least in duplicate.

(b) *Glucose, Asparagine, and Pyridoxamine (Glc/Asn/PM).* The Glc/Asn reaction mixture was modified by adding pyridoxamine (0.03 mmol) dissolved in 100 μ L of 0.1 M NaH₂PO₄ buffer (pH 6.8). The heating experiment was worked up as previously described. Experiments were prepared at least in duplicate.

(c) *Dose Effect.* Glc (0.3 mmol) and Asn (0.3 mmol) were mixed and transferred to Pyrex tubes, and variable concentrations of pyridoxamine, pyridoxine, pyridoxal, and vitamin C were added (0, 5, 10, 20, and 30 μ mol) dissolved in 100 μ L of 0.1 M NaH₂PO₄ buffer (pH

6.8). The experiment was heated at 140 °C for 30 min and cooled in ice–water. Samples were kept at 4 °C for analysis within the same working day or frozen for further analysis. The experiments were run at least in triplicate.

Acrylamide Analysis. One milliliter of distilled water was added to the heated mixtures, and the reaction solution was gently vortexed and centrifuged for 5 min at 4000 rpm for removing insoluble particles, if any. Appropriate dilution (100-fold) was made using distilled water and then purified on an Oasis-HLB solid phase extraction cartridge. The cartridges were washed with 1.0 mL of methanol and 1.0 mL of water prior to use. The sample dilution (1.0 mL) was loaded on the cartridge, and the first drops were discharged. The eluate was filtered through a 0.45 μ m filter and subjected to a liquid chromatography–diode array detector (LC-DAD). The results were confirmed by using liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS).

The quantification of acrylamide was conducted with a Shimadzu HPLC system (Kyoto, Japan) equipped with a LC-20AD pump, a SIL-10ADvp autosampler, a CTO-10ASVP oven, and a DAD (SPD-M20A). The chromatographic separations were performed on an Inertsil ODS-3 column (250 \times 4.6 mm, 5 μ m). The mobile phase condition was isocratic at 100% ultrapure water at a flow rate of 0.6 mL/min at 32 °C. Acrylamide was detected at 210 nm. The quantification of AA was performed using a calibration curve in the range of 5–1000 μ g/L. The limit of quantitation (5 μ g/L) was similar to that found by other authors (13).

Confirmatory LC-ESI-MS analysis were performed as described by Rufán-Henares et al. (14) using an Agilent 1100 HPLC system (Waldbronn, Germany) consisting of a quaternary pump, an autosampler, and a temperature-controlled column oven, coupled to an Agilent 1100 MS detector equipped with an electrospray ionization interface. The analytical separation was performed on an Inertsil ODS-3 column (250 \times 4.6 mm, 5 μ m; GLC-Sciences Inc., Kyoto, Japan) using an isocratic mixture of 0.2% aqueous solution of formic acid at a flow rate of 0.6 mL/min at 25 °C. Data acquisition was performed, with a delay time of 8 min, in a selected ion monitoring (SIM) mode using the following interface parameters: drying gas (N₂, 100 psig) flow of 12 L/min, nebulizer pressure of 45 psig, drying gas temperature of 350 °C, capillary voltage of 3 kV, and fragmenter voltage of 70 eV. Monitored ions were *m/z* 72.1 for acrylamide and *m/z* 75.1 for ¹³C₃-labeled acrylamide. An acrylamide calibration curve was built in the range of 2–100 μ g/L. The accuracy of the procedure was recently demonstrated for potato crisps in an interlaboratory comparison study organized by the Institute of Reference Materials and Measurements, yielding a *z* score of −0.5. The analyses are integrated within the scope of a certified laboratory controlled by AENOR (Spanish Association for Standardization and Certification).

Analysis of 3-Aminopropionamide (3-APA). 3-APA was analyzed according to the procedure reported by Bagdonaite et al. (15) with some minor modifications. Samples (200 μ L) were dissolved in 200 μ L of 0.5 M NaHCO₃ (pH \sim 8) and then derivatized with dansyl chloride. To 100 μ L of the mixture was added 100 μ L of dansyl chloride solution (5 mg/mL in acetone) in a test tube. The mixture was vigorously mixed for 3 min and left in the dark overnight. Twenty microliters of a glycine solution (100 mg/mL) was added, vortexed for 1 min, and left for 15 min. The extraction of the sample was done with 1 mL of diethyl ether, twice. The combined extracts were dried with nitrogen, and the residue was dissolved in 1 mL of acetonitrile and filtered at 0.45 μ m. A Shimadzu HPLC system (Kyoto, Japan) equipped with an LC-20AD pump, an LC-20AD/AT low-pressure gradient former, a SIL-10ADvp autosampler, a CTO-10ASVP oven, and an RF-10AxL fluorescence detector controlled by a CBM-10A communication bus module was used. The chromatographic separations were performed on a Mediatec-Mediatec-C18 analytical column (25 \times 0.40 cm, 5 μ m, Tecknokra, Barcelona, Spain) using a gradient elution of ultrapure water (phase A) and acetonitrile (phase B) at a flow rate of 0.8 mL/min at 32 °C. Data acquisition was performed by acquiring chromatograms at an excitation wavelength of 320 nm and an emission of 500 nm. The column was equilibrated in 90% phase A and 10% phase B; the gradient was as follows: time 0–2 min, 30% B; time 12 min, 70% B; time 20 min, 70% B; time 21 min, 10%, held until the end of the run (30 min). The quantification of 3-APA was performed using a calibration curve. Stock solution of 3-APA was prepared at a concentration of 10000

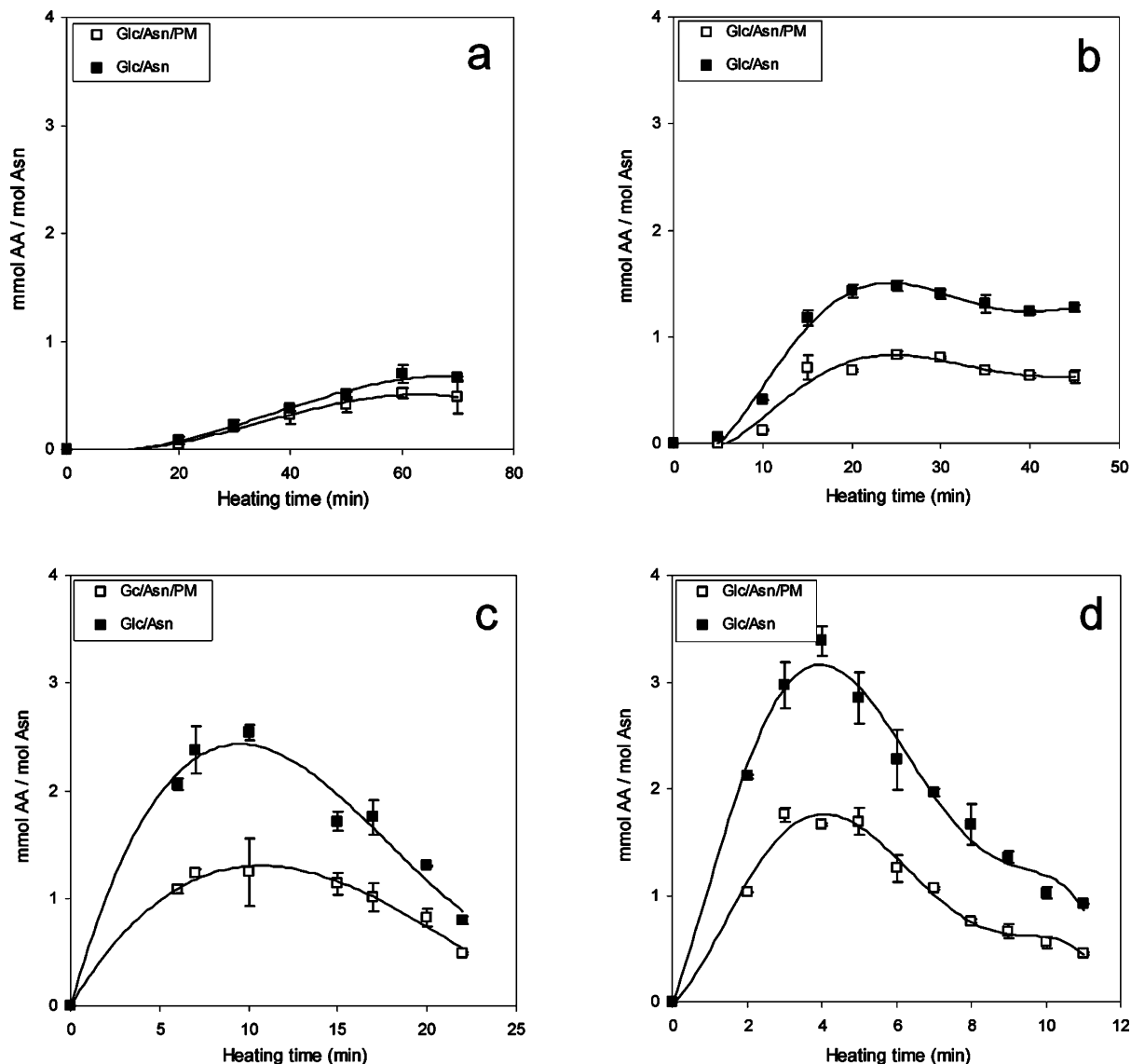


Figure 1. Kinetics curve of acrylamide formation and elimination in glucose/asparagine model system (solid box, control) and in glucose/asparagine/pyridoxamine model system at 120 °C (a), 140 °C (b), 160 °C (c), and 180 °C (d).

$\mu\text{g/L}$ dissolved in 0.25 M NaHCO_3 (pH 8). Working standards were freshly prepared by diluting the stock solution to concentrations of 100, 200, 300, 400, 500, 750, and 1000 $\mu\text{g/L}$.

Determination of Glucose (Glc). Samples were diluted (1:10) with distilled water and then analyzed for Glc by HPLC-RI, consisting of an MD-420 pump, an MD-465 autosampler, a refractive index detector (Erma Inc., Tokyo, Japan), and a temperature-controlled column oven, all from Kontron Instruments (Milan, Italy). The chromatographic separations were performed on an ION-300 polymeric resin column (300 mm \times 7.8 mm, Interaction-Laboratory, San Jose, CA) at 50 °C. A sulfuric acid solution (1 μM) was used as eluent at 0.4 mL/min. Glucose was recorded with a refractive index detector (RID-10A, Shimadzu, Tokyo, Japan) and quantified by the external standard method within the range of 0.01–0.8 g/100 mL.

Determination of Asparagine (Asn). Asn was analyzed in a plate reader by an automated procedure. A 20 μL aliquot of sample and 180 μL of 0.1 M borate buffer (pH 10) were placed per well in a 96-well microplate (Biogen Científica, Madrid, Spain). Sample was previously diluted in borate buffer (1/1000). The plate-reader automatically dispensed 50 μL of OPA solution. The microplate was shaken for 15 s, and the fluorescence was recorded at 360 and 460 nm excitation and emission wavelengths, respectively. A Synergy HT-multimode microplate reader with automatic reagent dispenser and temperature control from Biotek Instrumens (Winooski, VT) was used. Biotek Gen5 data analysis software was used. The OPA solution was daily prepared and

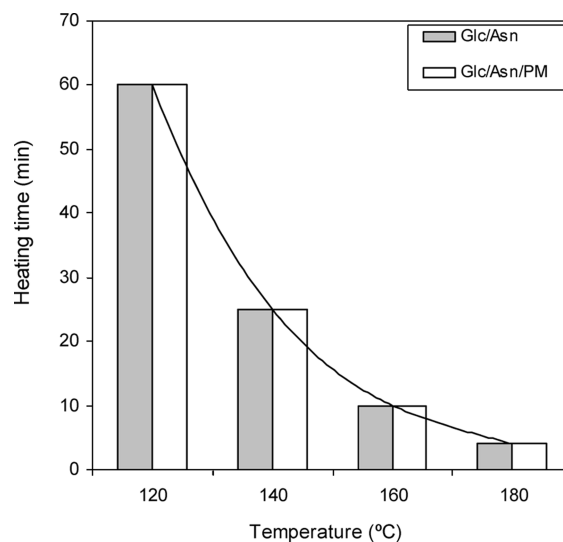


Figure 2. Time necessary (min) to reach the maximum level of acrylamide formation at each temperature investigated in the glucose/asparagine (Glc/Asn) and glucose/asparagine/pyridoxamine (Glc/Asn/PM) model systems.

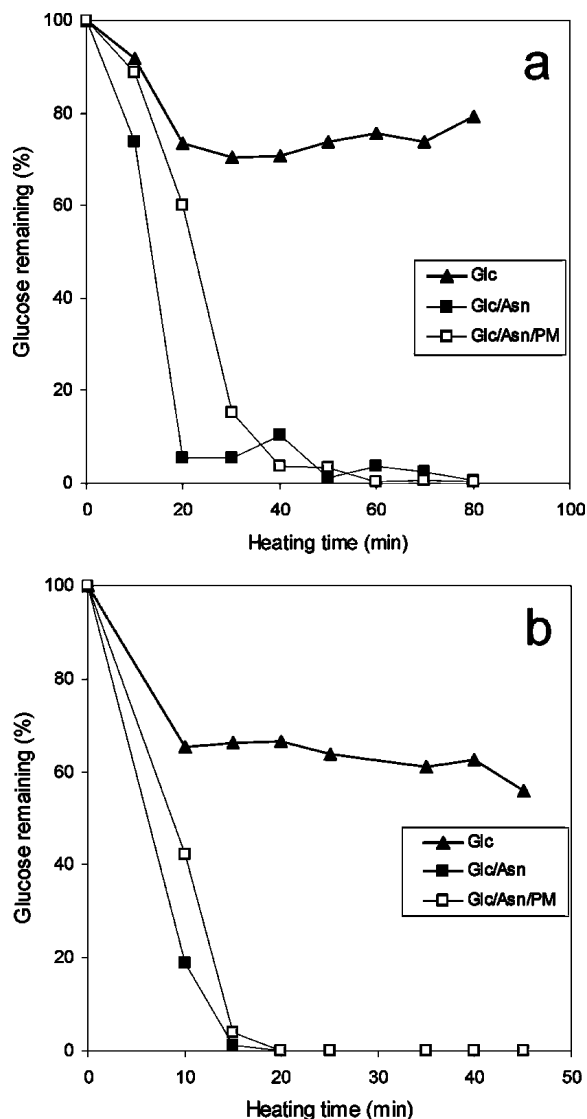


Figure 3. Reactivity of glucose (expressed as percentage of remaining glucose) in the glucose, glucose/asparagine, and glucose/asparagine/pyridoxamine systems at 120 and 140 °C. Residual standard deviation was below 5%.

100-fold diluted with borate buffer. The OPA stock solution (stable for 1 week) was prepared 6 h before use and stored in the dark at 4 °C and contained 100 mg of *o*-phthaldehyde dissolved in 1.0 mL of methanol, 500 μ L of β -mercaptoethanol, and 8.5 mL of 0.1 M borate buffer (pH 10). A blank using borate buffer instead of the sample and calibration solutions (10, 25, 50, 100, 200, and 300 mM asparagine) was used in each assay. Asparagine solutions were also diluted 1000-fold with borate buffer.

Analysis of Pyridoxamine. PM was quantified by a HPLC—fluorescence according to the method of Nagaraj et al. (16). Sample (10 μ L) was injected into a Kromasil column (250 mm \times 4 mm, 5 μ m, Sugerlabor, Madrid, Spain). The samples were appropriately diluted with distilled water. The vitamin was eluted in a gradient with 5% heptafluorobutyric acid (phase A) and 100% acetonitrile (phase B) at 1 mL/min. The column was equilibrated in 95% phase A and 5% phase B. The elution program was as follows: time 0–1 min, 5% B; time 10 min, 20% B; time 11 min, 40% B; time 12 min, 40% B; time 20 min, 5% B; time 45 min, 0% B. Data acquisition was performed by acquiring chromatograms at an excitation wavelength of 290 nm and an emission wavelength of 395 nm. The quantification of pyridoxamine was performed using a calibration curve. Stock solution of PM was prepared at a concentration of 130 μ g/mL.

Measurement of Browning. Two hundred microliters of reaction mixture was placed per well in a 96-well microplate (Biogen Científica).

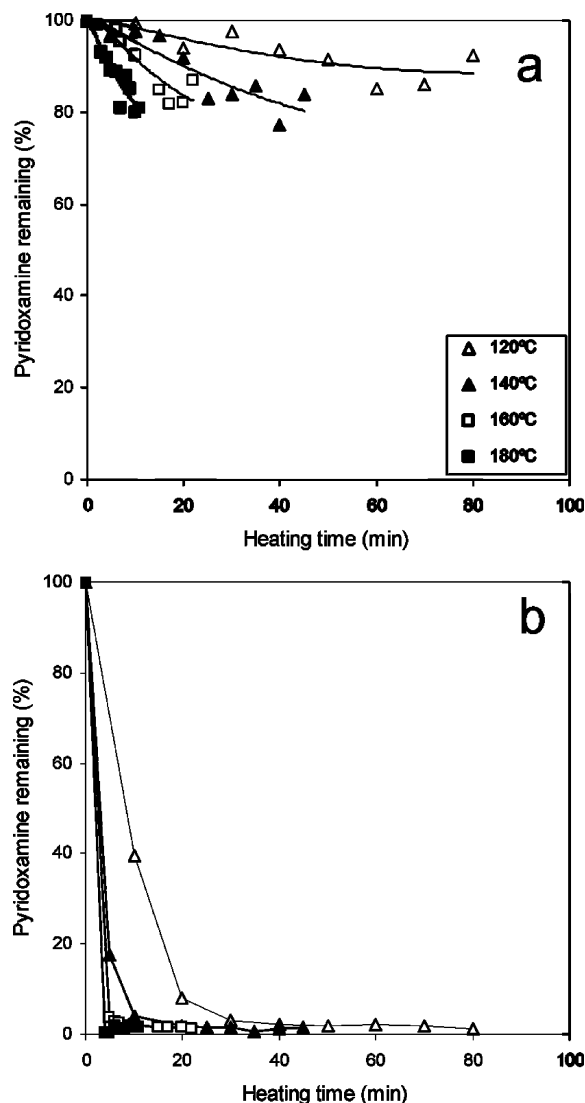


Figure 4. Reactivity of pyridoxamine (expressed as percentage of remaining pyridoxamine) in a pyridoxamine system (a) and in a glucose/asparagine/pyridoxamine system (b). Residual standard deviation was below 3%.

Browning was measured at a wavelength of 420 nm after appropriate dilution. The instrument for determining A_{420} was a microplate reader (BioTek Instruments).

Statistical Analysis. Data were analyzed using Microcal Origin, version 7.5 (Origin Laboratory Corp., Northampton, MA). Values are presented as means \pm SD. Differences with $P < 0.05$ were considered to be statistically significant using the Tukey test.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of Pyridoxamine on the Formation of Acrylamide.

Two model systems (Glc/Asn, Glc/Asn/PM) were designed for studying the fate of PM on the chemistry of AA formation. Systems were prepared under low-moisture conditions in closed glass tubes to resemble the processing of cereals under baking conditions and heated at 120–180 °C for different times. The amount of water present in the matrix has an important effect on the yield of AA, being dramatically reduced in both dry systems and with water content higher than 25%. Model systems of Asn and substances with carbonyl residues, both in dry and aqueous solutions, have been largely used to elucidate the pathways of acrylamide formation (see refs 2, 5, and 13).

Figure 1 illustrates AA formation in the presence of PM (Glc/Asn/PM) as compared with a control model system (Glc/

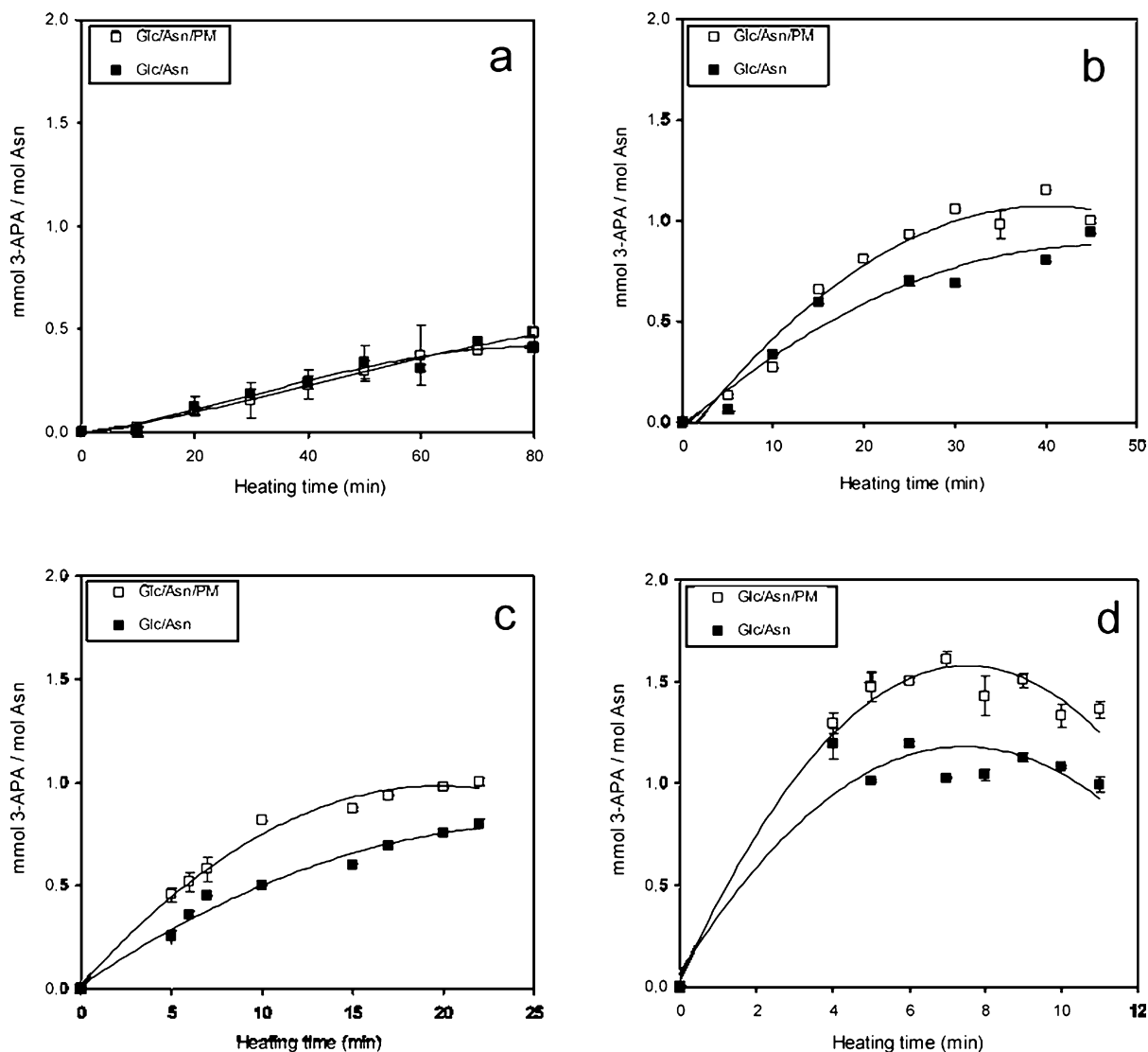


Figure 5. Formation of 3-aminopropanamide in glucose/asparagine model system (solid box; control) and glucose/asparagines/pyridoxamine model system at 120 °C (a), 140 °C (b), 160 °C (c), and 180 °C (d).

Asn) without the addition of PM at different temperatures and times. Classical kinetics of AA in the MR describe both the formation and elimination processes for which several different mathematical models have been drawn to elucidate the process and follow two consecutive first-order reactions (see refs 13 and 17). Kinetic modeling of AA formation/elimination is not the aim of this paper. Results obtained for the Glc/Asn model system are in line with results in model systems (see ref 18) and foods (19) reported in the literature, where prolonged heating times and high temperatures decreased the net formation of AA. AA has two reactive sites, the conjugated double bond and the amide group, and it has been proposed that losses of acrylamide are due to polymerization, evaporation, and Michael addition reactions with other food constituents (5). At 120 °C a plateau was observed after 60 min of heating where the formation and elimination of AA are in balance. Inhibition of AA by PM was observed at all temperatures but become relevant at temperatures >120 °C. As expected, the time to reach the maximum level of acrylamide was reduced by increasing temperature, being 60, 30, 10, and 4 min for 120, 140, 160, and 180 °C, respectively, but the time to reach the maximum level of AA for each temperature remained equal in both systems and was not affected by the addition of PM as depicted in **Figure 2**.

Becalski et al. (17) reported in dry systems that the amount of AA was reduced when the temperature was increased from 155 to 185 °C, at least when heating was longer than 10 min. It is clear that AA is an intermediary of the MR rather than an end-product, which implies that it is also subject to further degradation reactions as has been clearly shown by kinetic modeling (13). If percentages of AA reduction are compared at the time at which the highest AA was formed, inhibition rates of 25, 44, 51, and 51% were obtained at 120, 140, 160, and 180 °C, respectively. Inhibition of AA by PM was more effective at higher temperatures, at which up to 51% of reduction was obtained, which is promising for its further application during baking of cereal products.

In line with the literature, with increasing temperature, the reaction rate of both AA formation and elimination increased (13, 20), but it is worth noting that the curves of both Glc/Asn and Glc/Asn/PM systems showed the same rate of acrylamide formation/elimination. A correlation was observed between the time necessary to reach the maximum AA yields at each temperature, providing supportive evidence that was described before (**Figure 2**), and it was not affected by the presence of PM. In line with previous studies, time and temperature drive AA formation (19, 21), but PM did not induce new chemical pathways for AA and just a net reduction in the reaction rate was suggested.

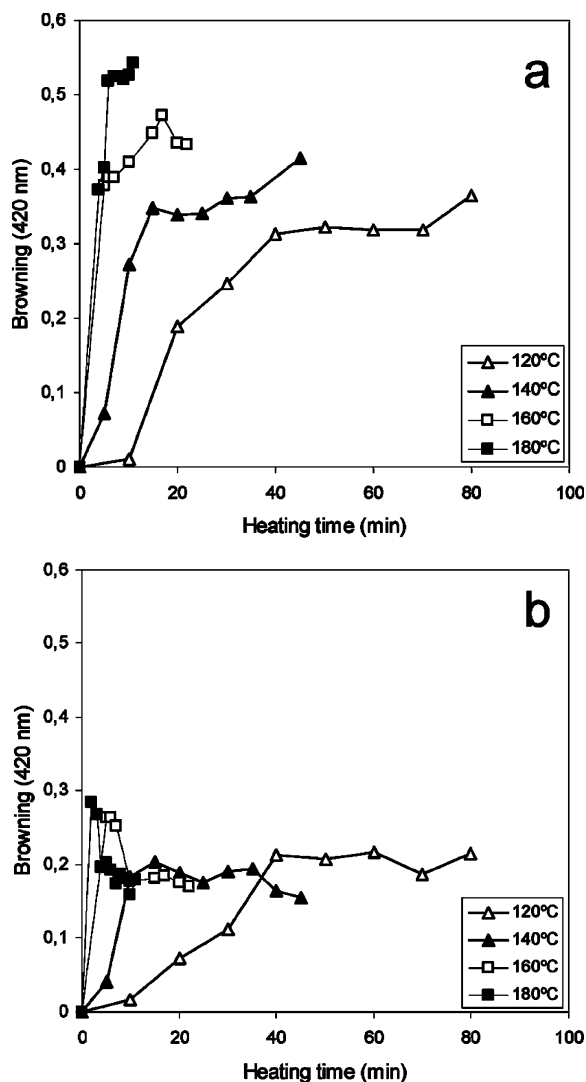


Figure 6. Browning (expressed as absorbance at 420 nm) in a glucose/asparagine system (a) and in a glucose/asparagine/pyridoxamine system (b). Residual standard deviation was below 7%.

Effects of PM on Glc, Asn, 3-APA, and Browning. For better understanding of whether the presence of PM in the reaction mixture influences the mechanism of reaction for AA formation, Glc and Asn were analyzed as reactants. As expected, consumption of Glc was increased with the presence of amino groups, and the reaction was rapidly catalyzed at high temperatures. **Figure 3** shows the glucose remaining (percent from initial glucose content) in Glc, Glc/Asn, and Glc/Asn/PM model systems. The rate of glucose decomposition was just slightly reduced at 120 °C (**Figure 3a**) and 140 °C (figures **3b**) by the addition of PM. At higher temperatures, the reaction took place so quickly that the potential effect of PM on Glc degradation could not be observed or quantified (data not shown). At physiological conditions it had been demonstrated that PM was able to trap hexoses and pentoses by forming a Schiff base and finally degrades into unknown compounds and pyridoxal (22), but this situation cannot be extrapolated to classical cooking temperatures.

In the case of degradation of Asn, an increase in the temperature led to higher losses as time increased in the Glc/Asn model, but Asn remained when heated alone (data not shown). These results are in agreement with previous papers (13, 23). In contrast, the degradation rate of Asn was not significantly affected by the addition of PM regardless of the temperature

applied. Average values of 30, 21, 17, and 9% for remaining Asn were obtained at 120, 140, 160, and 180 °C, respectively. Moreover, in the Glc/Asn model system, Glc was consumed more rapidly than Asn, which is in line with results reported in the literature (see ref 13). This fact can be explained by the regeneration of Asn from the initial condensation products such as the Amadori rearrangement product and the possible formation of diglucosylamine (10, 24). It was concluded that PM did not influence significantly the rates of glucose and asparagine consumption, and its effect on AA formation would take place in a more advanced stage of the reaction.

The thermal stability of PM was also evaluated in the presence of Glc and Asn, where thermal decomposition of PM is limited when heated alone (**Figure 4a**). Degradation was found to be up to 20% depending of the temperature and time, indicating that most of the PM remains reactive. However, degradation of PM is rapidly enhanced in the presence of Glc and Asn in the reaction media, being almost consumed after only a few minutes (**Figure 4b**) because PM is participating in the advanced stages of the MR. At 160 and 180 °C a complete loss of PM was observed after just 2 min of reaction. Then, PM reacted very efficiently in the Glc/Asn reaction system, where PL and PN are also detected as reaction products in the chromatogram profile as well as other minor unknown compounds.

Previous studies have demonstrated that 3-APA is a transient intermediate in AA formation during thermal treatment (15, 25). Furthermore, it may also be formed by enzymatic decarboxylation of Asn (26), via decarboxylation of the Schiff base (4), and through the Schiff base formed from Asn and α -hydroxycarbonyl (27) or reaction with pyruvic acid (5). This point was confirmed in the present study when the concentration of 3-APA in the reaction mixtures clearly showed an exponential increase followed by a decrease after prolonged time depending on the temperature (**Figure 5**). When the temperature was increased, 3-APA yields increased in both model systems. However, the presence of PM did not show an inhibitory action on 3-APA; in contrast, PM enhanced the net formation of 3-APA at 140, 160, and 180 °C (no significant effect was found at the lowest temperature). These data suggest that the action mechanism of PM could be taking place at this step, blocking the reaction of 3-APA through AA or blocking other routes of AA formation (such as degradation of the Amadori products or Schiff base and formation of reactive intermediary compounds) through the formation of 3-APA.

Browning is a classical feature of the extent of the MR in its advanced/final stages, and it has been directly related to AA formation in both model systems and foods (see ref 28). **Figure 6** depicts the extent of browning in the control model system and with the addition of PM. In the Glc/Asn model (**Figure 6a**), browning increased rapidly with temperature until a maximum; after that, browning remains more stable with time. Results are in line with previous studies (17). Similar behavior was observed in the Glc/Asn/PM system (**Figure 6b**). Browning was also directly related with the temperature, where a maximum is obtained. At 120 and 140 °C, browning increased steadily, whereas at 160 and 180 °C the absorbance reached a peak and finally decreased followed by a plateau. However, browning was nearly 2-fold less in the presence of PM. These findings indicate that PM strongly reduces the advanced and final stages of the MR and, subsequently, PM action on AA is connected to its inhibitory effect on the activity of the MR and the formation of intermediary reactive compounds as reported for in vivo studies.

Dose–Response and Structure-Related Effect of PM on AA Formation. The dose–response of different vitamins on AA

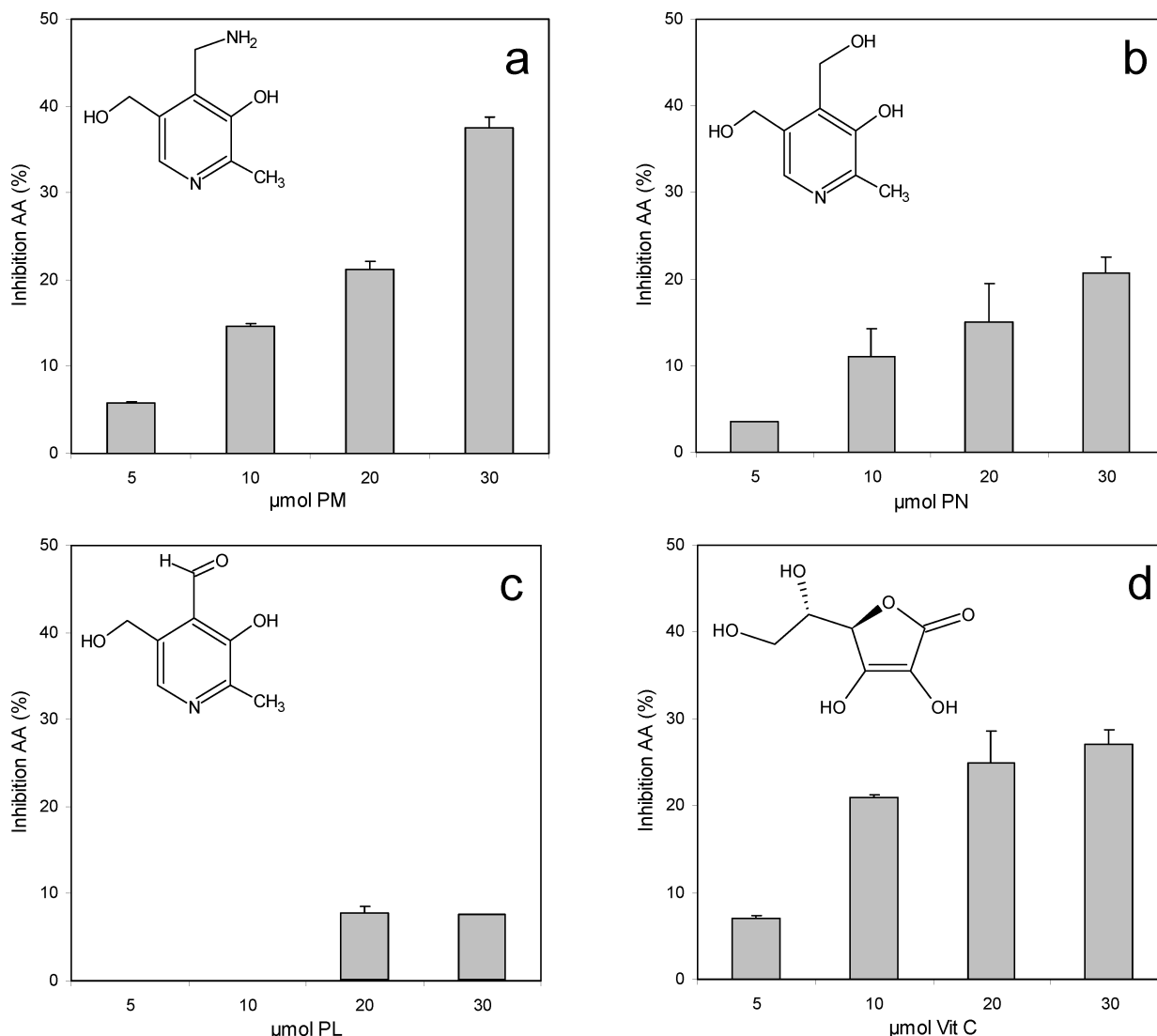


Figure 7. Dose–response effect of PM on the acrylamide inhibition (percentage from control) in a glucose/asparagine model system with added pyridoxamine (a), pyridoxine (b), pyridoxal (c), and ascorbic acid (d).

formation was investigated. For this purpose, three B₆ derivatives (PM, PN, PL) and vitamin C at different concentrations (5, 10, 20, and 30 μmol) were added to the Glc/Asn model system and heated at 140 °C for 30 min. Results are depicted in **Figure 7** and are expressed as percentage of AA inhibition as compared with the control system without the addition of vitamin. All of the compounds showed inhibition activities to some extent, except for pyridoxal at concentrations of 5 and 10 μmol , which did not show significant differences from control. However, a dose-dependent response for PM, PN, and vitamin C was observed. At the highest concentration tested (30 μmol), PM, PN, PL, and vitamin C reduced the formation of AA by 38, 21, 8, and 27%, respectively. Among the vitamins examined, PM provided the highest inhibition rates followed by vitamin C and pyridoxine. Pyridoxal (the alcohol form of vitamin B₆) appeared to inhibit acrylamide formation only very slightly. On the other hand, vitamin C showed a moderate inhibition, confirming the protective action against acrylamide found in previous paper, mainly owing to lowering of the pH (19, 29). It is observed that the dose–response for vitamin C is not linear and a degree of saturation is observed at 30 μmol . However, the activity of PM increased linearly with time, showing a remarkable dose–response.

It is interesting to compare the different responses observed between the inhibition rates for the three forms of vitamin B₆. This

finding could be attributed to a structure-related effect (**Figure 7**). It has been demonstrated that in the case of PL the inhibition involves competitive Schiff base condensation of the aldehyde group with protein amino groups at glycation sites (30). In this respect, the inhibition exerted by PM necessarily follows a different pattern, as it lacks an aldehyde group as described below. In contrast, some authors have reported that PN is not an AGE inhibitor (9). The structural features of PM are critical in the catalysis of transamination reactions, where important residues are the phenolic hydroxyl group and the aminomethyl group at positions 3 and 4 of the pyridinium ring, respectively. PM was effective in blocking carbonyl compounds; the amino group reacts with the carbonyl moiety of α -keto acid, which is the key point of its usefulness for AA mitigation. Then, PM can act through nucleophilic reactions with carbonyl intermediates in the MR, autooxidation of carbohydrates, or lipid peroxidation.

It has been frequently reported that PM is a potent inhibitor of the formation of AGEs (9, 10). This discovery stimulated our interest in this B₆ vitamin as a possible inhibitor of AA because the formation of this compound is closely linked to the MR. AA formation involves the condensation between carbonyl groups of reducing sugars with amino groups to form *N*-glycoconjugate, which is in equilibrium with the Schiff base (3). Recently, it has been described that the Schiff base

mentioned is the first step in the formation of AA (4, 5). Our results suggest that PM did not affect this early step of the MR because it did not greatly influence the decomposition of the reactants at 140, 160, and 180 °C. The effect of PM in the degradation rates of Glc and Asn was residual.

Previous studies indicated that α -hydroxycarbonyls are much more efficient than α -dicarbonyls in converting asparagine into AA (5), but opposing evidence has also been reported recently. Yuan et al. (31) showed that almost 80% of AA was formed through participation of α -dicarbonyls such as methylglyoxal. Similar results were obtained by Zyzak et al. (4) studying AA formation in a semidry food model system, showing that a variety of carbonyl sources (glucose, ribose, glyceraldehyde, glyoxal) could generate AA from Asn under heating. The reactivity of carbonyl is higher when the sugar chain is shorter; glyoxal becomes 3-fold more reactive than glucose on a molar basis. Then, discrepancies could be due to the water content in the reaction medium used when the reaction is limited in dried systems at pyrolysis conditions. Amrein et al. (32) also concluded that methylglyoxal and glyoxal play important roles in AA formation in model systems. Therefore, the inhibition mechanism of PM might be related with these compounds because it is known that this form of vitamin B₆ is capable of reacting with the reactive dicarbonyls intermediates of the MR, especially glyoxal, methylglyoxal, glycolaldehyde, or 3-deoxyglucosones (10, 16), forming stable adducts (33) that would inhibit the conversion to the next steps of the reaction. The action mechanism is attributable to its structural features as mentioned before; PM possesses a nucleophilic amino group (see **Figure 7a**) that has the capacity to scavenge toxic carbonyl compounds, inactivating these key intermediates on the AA and thereby preventing progression to its formation. Nagaraj et al. (16) concluded that the inhibitory effect of PM is mediated by the formation of a methylglyoxal–pyridoxamine dimer in biological systems. In our investigation, we were not able to identify the formation of dimers between PM and dicarbonyls or PM degradation products, but this aspect is still under investigation due to the complexity of chromatographic profiles in the Glc/Asn/PM system.

The strong decrease in the degree of browning by the addition of PM found in the reaction mixture also confirmed the inhibitory action of PM on AA formation as the color is directly associated with its formation through the MR (28, 34). It is important to stress that this suppression of the browning confirms the hypothesis of the capacity of PM to trap these colored compounds and precursors formed during the degradation of sugars in the MR. Nevertheless, the inhibitory effect is limited not only to scavenging of dicarbonyl compounds but also to blocking the pathway of formation of acrylamide via 3-APA. There was an increase of 3-APA formation likely because of no conversion to AA, confirming the studies reported by other authors where 3-APA takes part in acrylamide formation (25, 26). In addition, 3-APA is converted into AA more efficiently in the presence of aldehydes (35). Consequently, PM reacts with aldehydes and therefore competes with 3-APA for available carbonyl groups.

PM suppressed AA formation even at the lowest concentration investigated. PM is more effective as compared with the other B₆ vitamers, pyridoxal and pyridoxine; even inhibition was considerably higher than vitamin C at the same concentration studied. On the basis of the data obtained in the present work, a working hypothesis was settled on, whereby the PM mechanism of action to reduce AA formation is mediated through scavenging dicarbonyls. Dicarbonyl compounds such as glyoxal

and methylglyoxal are established as important intermediates of the MR (a) from retro-aldol fragmentation of Schiff base, (b) from autoxidation of sugars, (c) from oxidative degradation of the Amadori product, and (d) and as part of the end-products of lipid peroxidation. At this point, the formation of conjugated intermediary compounds from the reaction of PM and advanced products of the MR is not confirmed. Therefore, a forthcoming investigation is focused on the determination of methylglyoxal or glyoxal pyridoxamine dimers and adducts of two molecules of PM and two molecules of MG or glyoxal. On the other hand, application of PM as a mitigating agent for acrylamide formation is also potentially relevant to foods rich in lipids where advanced products of oxidation have been recently implied in the formation of acrylamide.

ACKNOWLEDGMENT

We thank D. Gómez for technical assistance.

LITERATURE CITED

- (1) FAO/WHO. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Summary and conclusions report from sixty-fourth meeting, Rome, 8–17 Feb 2005; available at ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa64_summary.pdf.
- (2) Friedman, M.; Levin, C. E. Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6113–6140.
- (3) Mottram, D. S.; Bronislaw, L.; Wedzicha, A. T. D. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* **2002**, *419*, 448–449.
- (4) Zyzak, D. V.; Sanders, R. A.; Stojanovic, M.; Tallmadge, D. H.; Eberhart, B. L.; Ewald, D. K.; Gruber, D. C.; Morsch, T. R.; Strothers, M. A.; Rizzi, G. P.; Villagran, M. D. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4782–4787.
- (5) Stadler, R. H.; Roberts, F.; Riediker, S.; Varga, N.; Davidek, T.; Devaud, S.; Goldmann, T.; Hau, J.; Blank, I. In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5550–5558.
- (6) Leklem, J. E. Vitamin B₆. In *Modern Nutrition in Health and Disease*, 9th ed.; Shils M. E., Olson J. A., Shike M., Ross, A. C., Eds.; Williams and Wilkins: Baltimore, MD, 1999; pp 413–421.
- (7) Reddy, V. P.; Beyaz, A. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 646–654.
- (8) Alderson, N. L.; Chachich, M. E.; Youssef, N. N.; Beattie, R. J.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney Int.* **2003**, *63*, 2123–2133.
- (9) Booth, A. A.; Khalifah, R. G.; Hudson, B. G. Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation end-products: comparison with aminoguanidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *220*, 113–119.
- (10) Voziyan, P. A.; Metz, T. O.; Baynes, J. W.; Hudson, B. G. A post-amadori inhibitor pyridoxamine also inhibits chemical modification of proteins by scavenging carbonyl intermediates of carbohydrate and lipid degradation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 3397–3403.
- (11) Onorato, J. M.; Jenkins, A. J.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation reactions, also inhibits advanced lipoxidation reactions. Mechanism of action of pyridoxamine. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21177–21184.
- (12) Loeb, A. L.; Anderson, R. J. Antagonism of acrylamide neurotoxicity by supplementation with vitamin B₆. *Neurotoxicology* **1981**, *2*, 625–633.
- (13) Knol, J. J.; van Loon, W. A. M.; Linssen, J. P. H.; Ruck, A.-L.; van Boekel, M. J. S.; Voragen, A. G. J. Toward a kinetic model for acrylamide formation in a glucose–asparagine reaction system. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6133–6139.

- (14) Rufián-Henares, J. A.; Arribas-Lorenzo, G.; Morales, F. J. Acrylamide content of selected Spanish foods: survey of biscuits and bread derivatives. *Food Addit. Contam.* **2007**, *24*, 343–350.
- (15) Bagdonaite, K.; Viklund, G.; Skog, K.; Murkovic, M. Analysis of 3-aminopropionamide: a potential precursor of acrylamide. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2006**, *69*, 215–221.
- (16) Nagaraj, R. H.; Sarkar, P.; Mally, A.; Biemel, K. M.; Lederer, M. O.; Padayatti, P. S. Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats: characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *402*, 110–119.
- (17) Becalski, A.; Lau, B. P.-Y.; Lewis, D.; Seaman, S. W. Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 802–808.
- (18) Ehling, S.; Shibamoto, T. Correlation of acrylamide generation in thermally processed model system of asparagine and glucose with color formation, amounts of pyrazines formed, and antioxidative properties of extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4813–4819.
- (19) Rydberg, P.; Eriksson, S.; Tareke, E.; Karlsson, P.; Ehrenberg, L.; Törnqvist, M. Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7012–7018.
- (20) Vleeschouwer, K.; Van der Plancken, I.; Van Loey, A.; Hendrickx, M. Impact of pH on the kinetics of acrylamide formation/elimination reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7847–7855.
- (21) Bråthen, E.; Knutsen, S. H. Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread. *Food Chem.* **2005**, *92*, 693–700.
- (22) Adrover, M.; Volanova, B.; Muñoz, F.; Donoso, J. Inhibition of glycosylation processes: the reaction between pyridoxamine and glucose. *Chem. Biodivers.* **2005**, *2*, 964–975.
- (23) Vleeschouwer, K.; Planckena, I. V.; Loey, A. V.; Hendrickx, M. E. The kinetics of acrylamide formation/elimination in asparagine–glucose systems at different initial reactant concentrations and ratios. *Food Chem.* **2008**, *111*, 719–729.
- (24) Martins, S. I. F. S.; Van Boekel, M. A. J. S. A kinetic model for the glucose/glycine Maillard reaction pathways. *Food Chem.* **2005**, *90*, 257–269.
- (25) Granvogl, M.; Schieberle, P. Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5933–5938.
- (26) Granvogl, M.; Jezussek, M.; Koehler, P.; Schieberle, P. Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes—a minor but potent precursor in acrylamide formation. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4751–4757.
- (27) Schieberle, P.; Köhler, P.; Granvogl, M. News aspects on the formation and analysis of acrylamide. Chemistry and Safety of Acrylamide in Food. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2005**, *561*, 205–227.
- (28) Gökmen, V.; Açar, Ö.Ç.; Arribas-Lorenzo, G.; Morales, F. J. Investigating the correlation between acrylamide content and browning ratio of model cookies. *J. Food Eng.* **2008**, *87*, 380–385.
- (29) Levine, R. A.; Smith, R. E. Sources of variability of acrylamide levels in a cracker model. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4410–4416.
- (30) Khatami, M.; Suldan, Z.; David, I.; Li, W.; Rockey, J. H. Inhibitory effects of pyridoxal phosphate, ascorbate and aminoguanidine on nonenzymatic glycosylation. *Life Sci.* **1988**, *43*, 1725–1731.
- (31) Yuan, Y.; Zhao, G.-H.; Hu, X.-S.; Wu, J.-H.; Liu, J.; Chen, F. High correlation of methylglyoxal with acrylamide formation in glucose/asparagine Maillard reaction model. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *226*, 1301–1307.
- (32) Amrein, T. B.; Andres, L.; Giuseppe, G.; Manzardo, G.; Amado, R. Investigations on the promoting effect of ammonium hydrocarbonate on the formation of acrylamide in model system. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 10253–10261.
- (33) Voziyan, P. A.; Khalifah, R. G.; Thibaudeau, C.; Yildiz, A.; Jacob, J.; Serianni, A. S.; Hudson, B. G. Modification of proteins in vitro by physiological levels of glucose. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46616–46624.
- (34) Mustafa, A.; Andersson, R.; Rosen, H.; Kamal-Eldin, A.; Aman, P. Factors influencing acrylamide content and color in rye crisp bread. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5985–5989.
- (35) Perez-Locas, C.; Yaylayan, V. A. Further insight into thermally and pH-induced generation of acrylamide from glucose/asparagine model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6069–6074.

Received for review September 15, 2008. Revised manuscript received December 2, 2008. Accepted December 6, 2008. This work was carried out within the framework of COST 927 thermally processed foods: possible health implication. Research has been partly fund by Consejería Educación y Ciencia (CAM) under project ANALISYC Program, S-505/AGR-0312. G.A.-L. was the recipient of a grant from Conserjería de Educación de la Comunidad de Madrid.

JF802870T

3.2. Mecanismo de acción del efecto inhibidor de la piridoxamina sobre la formación de acrilamida

Como continuación al artículo anterior en el que se demostró que la piridoxamina era capaz de disminuir los niveles de acrilamida de manera significativa, probablemente debido al atrapamiento de los compuestos dicarbonílicos glicoxal y metilglicoxal, en este trabajo se pretende estudiar el efecto que tiene la piridoxamina en las vías de formación de estos intermedios.

Se utilizaron los sistemas modelo Glu-Asn del trabajo anterior en los cuales fueron analizados glicoxal y metilglicoxal. Se siguió el mismo procedimiento analítico que en el Capítulo 2, es decir fue necesaria una derivatización previa para producir las correspondientes quinoxalinas para que posteriormente pudieran ser cuantificadas por LC de fase inversa con detector DAD ($\lambda = 315 \text{ nm}$).

En presencia de la piridoxamina se observó una clara reducción (hasta un 44%) en los niveles de glicoxal y metilglicoxal a temperaturas superiores a 120 °C. Además, se comprobó que el porcentaje de inhibición fue dependiente de la dosis de piridoxamina.

Los resultados del presente estudio apoyan la hipótesis de nuestro trabajo anterior: la piridoxamina inhibe la formación de acrilamida a través de su acción sobre los compuestos dicarbonílicos.

Short communication

Acrylamide formation in model systems as influenced by the inhibitory effect of pyridoxamine towards dicarbonyls

.....

Acrylamide formation in low-moisture equimolar glucose/asparagine model systems is inhibited by pyridoxamine. The mechanism of action of pyridoxamine was linked to its capacity to scavenge dicarbonyls formed during browning reactions but was not experimentally confirmed in previous studies. The effect of pyridoxamine on the formation of glyoxal and methylglyoxal was investigated. Dicarbonyls were measured as their stable quinoxalines by liquid chromatography. A semi-dry model system containing glucose and asparagine and heated at temperatures between 120 and 180 °C was employed. A noticeable inhibiting effect of pyridoxamine on dicarbonyls compounds was found at temperatures higher than 120 °C till up to 44% of reduction. Dose-response of pyridoxamine was observed and the higher concentration of pyridoxamine used led to almost a 40% of reduction on dicarbonyls. Results strongly suggested that pyridoxamine might trap the toxic carbonyl intermediates formed in the glucose/asparagine model system and thereby, to prevent the pathway of acrylamide formation due to these reactive carbonyl compounds have been directly associated with its formation.

.....

G. Arribas-Lorenzo, F.J. Morales

Pendiente de publicar

INTRODUCTION

Acrylamide (AA) is formed during both industrial thermal processing and domestic cooking of foods through the Maillard reaction as the main mechanism (1, 2). There is enough evidence about the neurotoxic, genotoxic and carcinogenic effect of AA (3). AA formation in foods is dependent of several factors such as heat load, type and concentration of reactants, moisture, pH, and certain additives among others (4). Then small changes in the recipe or processing conditions will cause large changes in the final AA content in the product. AA is ubiquitous in the food supply although dietary exposure varies with food commodities and consumption habits of population for certain foods (5-7). In this sense, AA represents a potential food safety issue for consumers which are currently under close and deep evaluation by the different Food Safety Authorities.

The main mechanism of acrylamide formation in heated foods is the Maillard reaction between sugars and amino acids and several pathways have been proposed (1, 8-11). However, the role of the reactive carbonyl intermediates from the Maillard reaction, lipid oxidation and sugar fragmentation on the AA formation is still under investigation. Koutsidis et al. (12) showed that the tautomerisation of the carboxylated asparagine-carbonyl Schiff

base is the key step in AA formation and the type of carbonyls formed greatly influenced the yield. Furthermore, 3-aminopropionamide, a transient intermediate of the thermal degradation of asparagine, can be deaminated to form AA (8). Some studies have reported the role of α -dicarbonyls such as glyoxal or methylglyoxal in its formation since can react with amino groups (11, 13, 14). In addition, AA rapidly increased in cookies formulated with thermooxidised oil reaching levels about 59% higher as compared to the reference sunflower oil (15). This conforms that lipid oxidation produces a number of carbonyl derivatives which feedback the Maillard reaction and Strecker like reactions to form AA (16). Recently, Koutsidis et al. (17) showed a strong correlation between the unsubstituted pyrazine and AA which suggested the promotion of the formation of the Maillard reaction intermediates, and in particular glyoxal as the determining mode of action in a low-moisture asparagine-glucose model system.

In a previous study, we investigated the ability of pyridoxamine (PM) to inhibit AA formation in glucose/asparagine model systems (18). PM clearly reduced the yield of AA formation, but the mechanism of action was under investigation. We hypothesized dicarbonyls, derived from Maillard reaction, caramelization or lipid peroxidation, might be involved in AA formation due to PM is

capable of scavenging these reactive toxic intermediates (19, 20). Furthermore, PM is considered as a post-Amadori inhibitor capable of inhibiting the formation of advanced glycation end-products (AGEs) as well as advanced lipoxidation end-products (ALEs) formation (19, 21-24).

As a continuation of our research, herein it is investigated if the reduction of AA is closely associated to the inhibition rates of glyoxal (GO) and methylglyoxal (MGO) by PM. For this purpose, GO and MGO were measured as their stables quinoxalines by HPLC-DAD method in the reaction media in order to follow their response.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Glyoxal, methylglyoxal, orthophenylenediamine (OPD) and 5-methylquinoxaline (5-MQ) were supplied by Sigma (St. Louis, MO, USA). Methanol of HPLC grade was obtained from LabScan (Dublin, Ireland). Sodium dihydrogen phosphate monohydrate and glacial acetic acid were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Ultra pure water was used (Milli-Q system, Millipore Bedford, MA, USA). Oasis-HLB cartridges (30 mg, 1 mL) were supplied by Waters (Milford, MA, USA). All other chemicals and reagents used were described in Arribas-Lorenzo and Morales (2009).

Model Systems. Low-moisture model systems used were described in Arribas-Lorenzo and Morales (2009).

Determination and quantification of GO and MGO. Two-hundred μL were taken from heated model system and mixed with 375 μL of sodium phosphate buffer, 200 μL of OPD (10 mM) and certain amounts of 5-MQ (internal standard). The mixture was incubated for 3 h at 65-70 $^{\circ}\text{C}$ in an oven (model 235, J. P. Selecta, Barcelona, Spain). After cooling, 200 μL of acetic acid was added to the derivatized mixture. The sample was then loaded onto the solid phase extraction (SPE) column (Oasis-HLB) (the SPE step had previously been optimized, see Results and Discussion), and eluent was discharged. Next, 1 mL of a mixture of methanol:0.5% acetic acid (40:60, v/v) and eluent was discharged. Finally, 1 mL of methanol was passed through the cartridge and the eluent collected in an amberlite vial. The analysis was carried out at least in duplicate.

The quantification of GO and MGO was carried out by HPLC-UV according to the method of Arribas-Lorenzo and Morales (2009).

Statistical Analysis. Data are expressed as mean of two or more independent determinations. Differences with $P < 0.05$ were considered to be statistically

significant using the Tukey test. A Microcal Origin program version 7.5 (Origin Lab Corp., Northampton, MA) was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Heating time dependent profile of GO (Figure 1) and MGO (Figure 2) was evaluated in the low-moisture glucose-asparagine reaction models in the presence or absence of PM at four different

temperatures, 120 °C (a), 140 °C (b), 160 °C (c) and 180 °C (d). Levels of GO and MGO were expressed as μg per mL of reaction (after addition of 1 mL of water).

At 120 and 140 °C, the increase in dicarbonyls concentration was followed by a steady state in which the formation was probably in equilibrium with its degradation. At 160 and 180 °C, the increase was followed by a fast decrease, typical behaviour for intermediates.

Figure 1. Curve of GO in glucose/asparagine model system (solid box, control), and glucose/asparagine/pyridoxamine model system at 120 °C (a), 140 °C (b), 160 °C (c), and 180 °C (d)

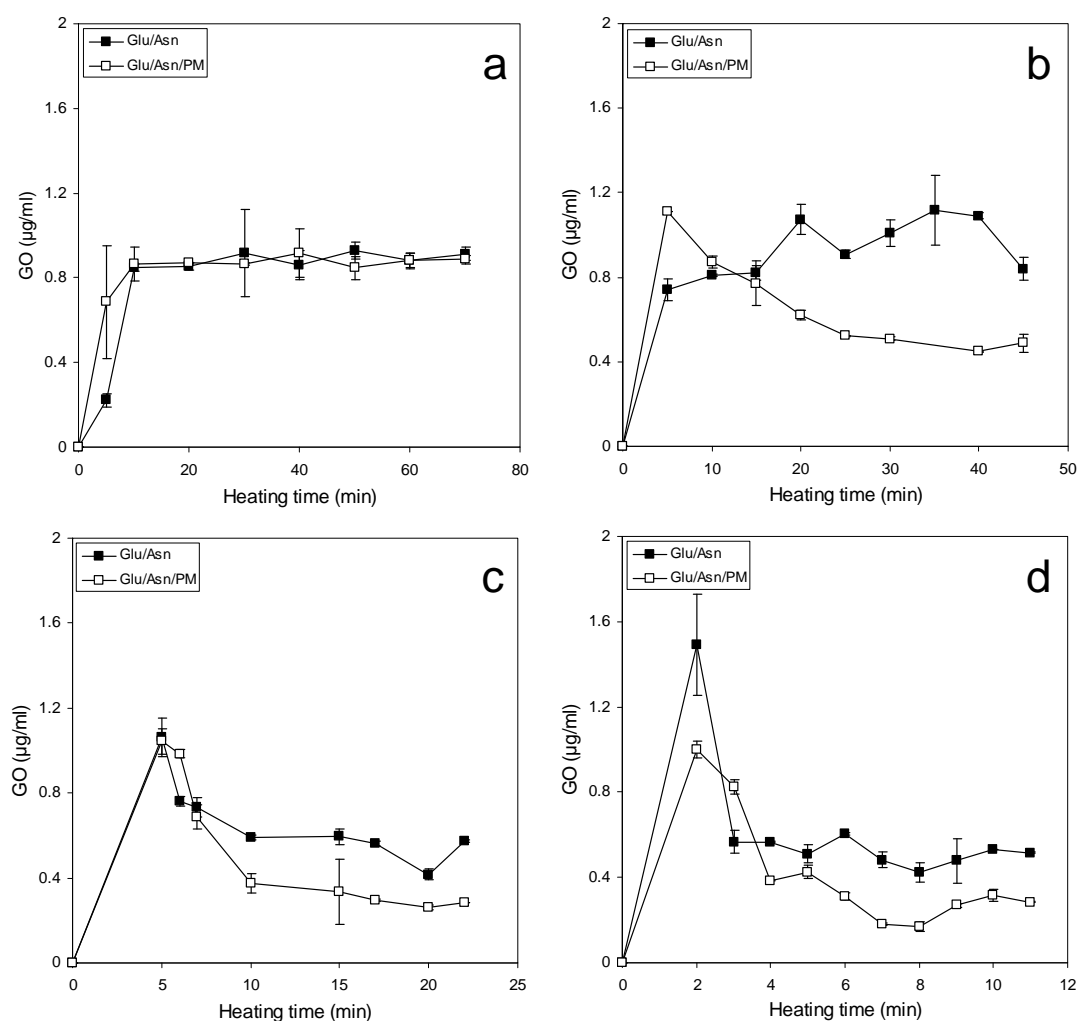
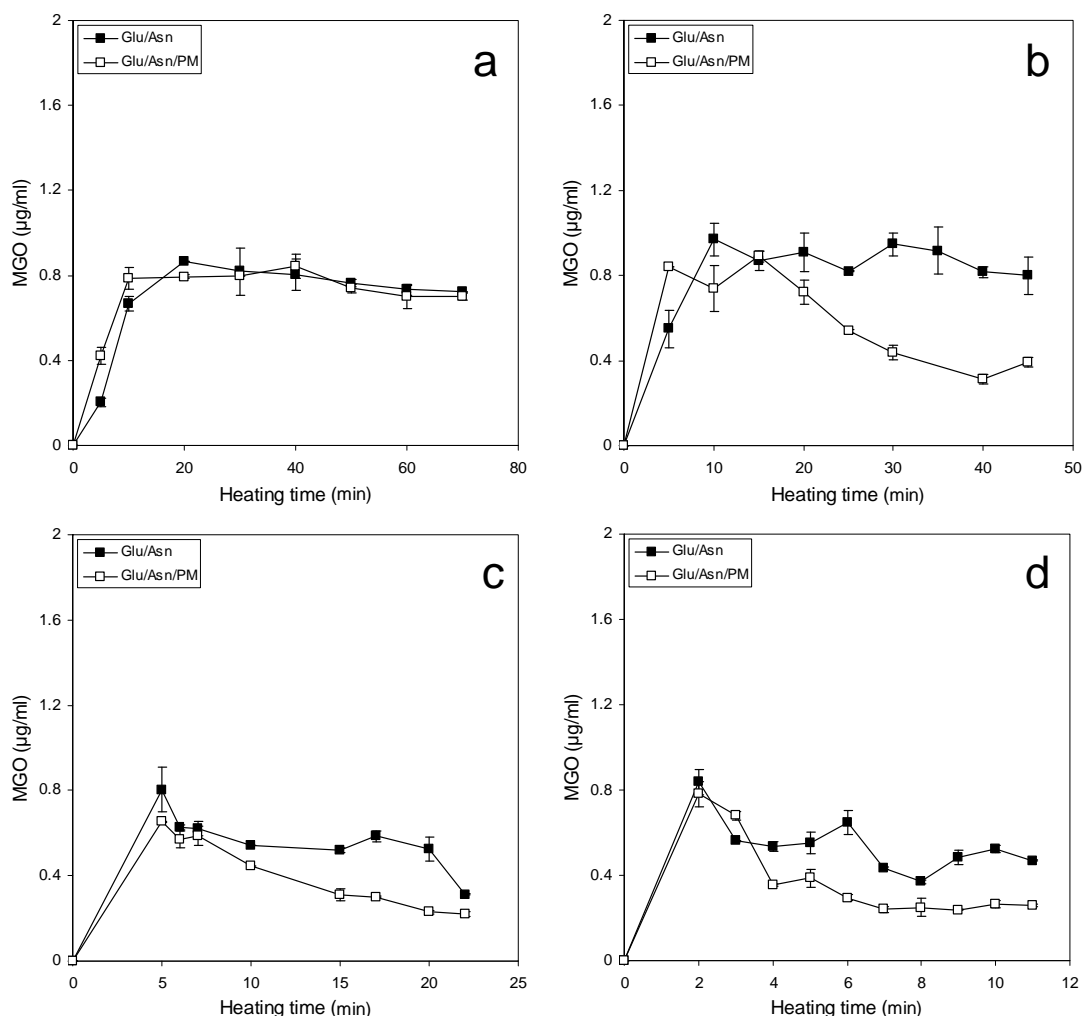


Figure 2. Curve of MGO in glucose/asparagine model system (solid box, control), and glucose/asparagine/pyridoxamine model system at 120 °C (a), 140 °C (b), 160 °C (c), and 180 °C (d).

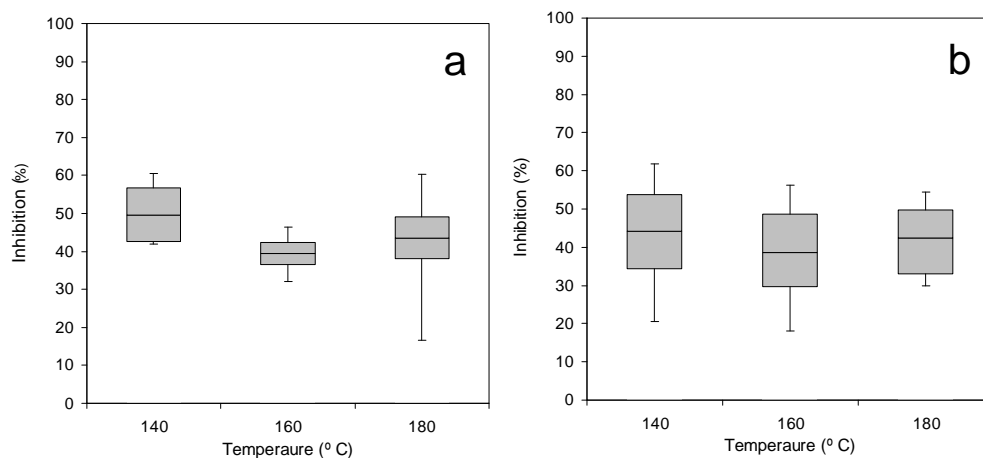


During heating, the presence of PM in the reaction media became relevant in the reduction of levels of dicarbonyls at 140, 160 and 180 °C but not at 120 °C. At a first stage it was not any reduction, and after of an initial period a decrease in GO and MGO concentration was observed with time. Then similar behaviour was found for both dicarbonyl compounds. In addition, our results agreed with previous studies demonstrating that time and temperatures

are parameters that affect MGO and GO formation (14, 25). It is worth noting that in our previous study the curves of acrylamide showed similar profile.

In order to describe the inhibitory effect of PM towards dicarbonyls, the percentage of inhibition for GO and MGO compared to control for all heating times at each temperature was depicted (**Figure 3**). Inhibition ranged from 17% up to 63% at 180 °C for GO, and in the case of MGO,

Figure 3. Inhibitory effect (%) of GO and MGO in glucose/asparagine model system at 140 °C for 30 min by addition of various levels of pyridoxamine.

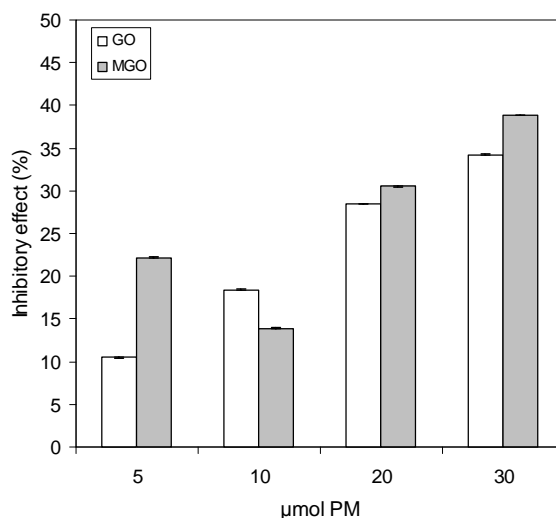


from 18% at 160 °C up to 62% at 140 °C. The mean inhibition percentages obtained were 50%, 39% and 44% for GO, and 44%, 39% and 43% for MGO at 140 °C, 160 °C and 180 °C, respectively. The inhibitory effect of PM was, therefore, in the same range for both dicarbonyls.

Experiments were further extended to investigate the dose effect of PM at different concentrations on the formation of GO and MGO in the glucose-asparagine model system heated at 140 °C for 30 min (**Figure 4**). Results were expressed as percentage of GO and MGO inhibition as compared with the reference system without PM. By adding 5, 10, 20, or 30 µmol into the model system, clearly PM suppressed the formation of the dicarbonyls compounds, being significantly different from the control. In the case of GO, with increasing amounts of PM, the reduction rate increased and it was

observed, thereby, a dose-dependent response. On the contrary, MGO showed a dose-dependent response only at concentration higher than 10 µmol. Nevertheless, the greatest inhibition of dicarbonyls (34% and 39% for GO and MGO, respectively) was achieved when PM was added to the model reaction system at the 30 µmol level. The results obtained in this work showed that of the four temperatures investigated, statistical analysis indicated that the content of both GO and MGO were inhibited by PM only at temperatures above 120 °C. Arribas-Lorenzo & Morales (18) demonstrated that PM inhibited AA yields in a low moisture equimolar Glu-Asn model system but the effect became markedly higher at temperatures above 120 °C achieving up to 51% of reduction at 160 and 180 °C. The reaction mechanism was still under investigation but it was tentatively

Figure 4. Percentages of inhibition of GO and MGO levels in a glucose/asparagine model system at 140 °C, 160 °C, and 180 °C.



suggested that PM was capable of reacting with the reactive dicarbonyls intermediates of the MR, specially glyoxal, methylglyoxal, glycolaldehyde or 3-deoxyglucosones blocking the conversion to next steps of the reaction. In the present study data showing the net reduction of GO and MGO in presence of PM in Glu-Asn model systems strongly support our previous hypothesis (18).

PM has been showed to be a very effective inhibitor of reactive carbonyl compounds formed by degradation of sugars or lipid peroxidations. Several experimental works provide convincing evidence in this direction: Vozyan et al. (29) tested that PM was capable of reacting with glyoxal and glycolaldehyde forming adducts. Nagaraj et al. (20) reported that PM inhibited the formation of advanced glycation products through the methylglyoxal-pyridoxamine

dimmer both in vitro and in diabetic rats and Chetyrkin et al. (26) tested PM protected proteins from functional damage by 3-DG. Although in this work it is not clear if PM reacts directly with GO and MGO forming adducts, it is reasonable to assume that PM suppressed the formation of these intermediates of the Maillard reaction, inactivating the next steps and thereby interrupting the AA formation. So, the idea that reactive carbonyl such as GO and MGO are main actors involved in acrylamide formation (13, 14, 17) is supported then by our results. Even, Koutsidis et al. (17) suggested the strong correlation between the formation of dicarbonyls, in particular GO, on the formation of AA, but the mode of action has to be determined.

In addition, in the earlier article it was observed a reduction on AA by PM at all times studied, on the contrary hereby, there was no inhibitory effect until a more prolonged time. For example, at 140 °C it was observed for 25 min, at 160 °C for 10 min and 180 °C for 4 min both GO and MGO. It is noteworthy that those times coincide with the times at which the concentration of acrylamide was maximum and from that point it started the elimination pathway. Thus, it is likely that PM only inhibits AA by dicarbonyls at final stages and many others factors like 3-APA might contribute to the inhibitory effect of AA as we demonstrated (18). To sum up our research based on model system confirms GO and MGO as the main intermediates on formation of AA and the capability of PM to inhibit them. There is a margin of action in order to act in certain key steps limiting the formation of dicarbonyls to decrease the amount of acrylamide formed through the Maillard reaction. But approaches in acrylamide reduction have to maintain the desirable colour and flavour appreciated by consumers before to transfer from model systems to real foods.

ACKNOWLEDGEMENTS

Research has been partly fund under project ANALYSIC (S-505/AGR-0312) and Spanish Ministry of Science and

Techonology (AGL 2005-01735). Gema Arribas-Lorenzo is gratefully to Conserjería de Educación de la Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo for PhD grant.

LITERATURE CITED

- (1) Mottram, D. S.; Bronislaw, L.; Wedzicha, A. T. D. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*. 2002, 419, 448-449.
- (2) Stadler, R. H.; Blank, I.; Varga, N.; Robert, F.; Hau, J.; Guy, P. A.; Robert, M. C.; Riediker, S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*. 2002, 419, 449-450.
- (3) Shipp, A.; Lawrence, G.; Gentry, R.; McDonald, T.; Bartow, H.; Bounds, J.; Macdonald, N.; Clewell, H.; Allen, B.; Van Landingham C. Acrylamide: Review of toxicity data and dose-response analysis for cancer and noncancer effects. *Crit. Rev. Tox.* 2006, 36, 481-608.
- (4) Friedman, M.; Levin, C. E. Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 6113-6140.
- (5) Mestdagh, F.; Lachat, C.; Baert, K.; Moons, E.; Kolsteren, P.; Van Peteghem, C.; De Meulenaer, B. Importance of a canteen lunch on the dietary intake of acrylamide. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 509-516.
- (6) Boon, P. E.; de Mul, A.; van der Voet, H.; van Donkersgoed, G.; Brette, M.; van Klaveren, J. D. Calculations of dietary exposure to acrylamide. *Mut. Res.* 2005, 580, 143-155.
- (7) Arribas-Lorenzo, G.; Morales, F. J. Dietary Exposure to acrylamide from potato crisps to Spanish population. *Food Addit Cont.* 2009, 26, 289-297.
- (8) Granvogl, M.; Schieberle, P. Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 5933-5938.
- (9) Stadler, R. H.; Blank, I.; Varga, N.; Robert, F.; Hau, J.; Guy, P. A.; Robert, M. C.;

- Riediker, S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*. 2002, 419, 449-450.
- (10) Weisshaar, R.; Gutsche, B. Formation of acrylamide in heated potato products - Model experiments pointing to asparagine as precursor. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. 2002, 98, 397-400.
- (11) Zyzak, D. V.; Sanders, R. A.; Stojanovic, M.; Tallmadge, D. H.; Eberhart, B. L.; Ewald, D. K.; Gruber, D. C.; Morsch, T. R.; Strothers, M. A.; Rizzi, G. P.; Villagran, M. D. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 4782-4787.
- (12) Koutsidis, G.; de la Fuente, A.; Dimitriou, C.; Kakoulli, A.; Wedzicha, B. L.; Mottram, D. S. Acrylamide and pyrazine formation in model systems containing asparagine. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 6105-6112.
- (13) Yuan, Y.; Zhao, G-H.; Hu, X-S.; Wu, J-H.; Liu, J.; Chen, F. High correlation of methylglyoxal with acrylamide formation in glucose/asparagine Maillard reaction model. *Eur. Food Res. Tech.* 2008, 226, 1301-1307.
- (14) Amrein, T. B.; Andres, L.; Giuseppe, G.; Manzardo, G.; Amado, R. Investigations on the promoting effect of ammonium hydrocarbonate on the formation of acrylamide in model system. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 10253-10261.
- (15) Arribas-Lorenzo, G.; Fogliano, V.; Morales, F. J. Acrylamide formation in a cookie system as influenced by the oil phenol profile and degree of oxidation. *Eur. Food Res. Tech.* 2009, 229, 63-72.
- (16) Zamora, R.; Hidalgo, F. J. Contribution of lipid oxidation products to acrylamide formation in model systems. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 6075-6080.
- (17) Koutsidis, G.; Simons, S. P. J.; Thong, Y. H.; Haldoupis, Y.; Mojica-Lazaro, J.; Wedzicha, B. L.; Mottram, D. S. Investigations on the Effect of Amino Acids on Acrylamide, Pyrazines, and Michael Addition Products in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 9011-9015.
- (18) Arribas-Lorenzo G.; Morales F. J. Effect of pyridoxamine on acrylamide formation in a glucose/asparagine model system. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 901-909.
- (19) Voziyan, P. A.; Metz, T. O.; Baynes, J.W.; Hudson, B.G. A post-amadori inhibitor pyridoxamine also inhibits chemical modification of proteins by scavenging carbonyl intermediates of carbohydrate and lipid degradation. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 3397-3403.
- (20) Nagaraj, R. H.; Sarkar, P.; Mally, A.; Biemel, K. M.; Lederer, M. O.; Padayatti, P. S. Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats: characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002, 402, 110-119.
- (21) Booth, A. A.; Khalifah, R. G.; Hudson, B. G. Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation end-products: comparison with aminoguanidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, 220, 113-119.
- (22) Booth, A. A.; Khalifah, R. G.; Todd, P.; Hudson B. G. In vitro kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs). Novel inhibition of post-amadori glycation pathways. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 5430-5437.
- (23) Khalifah, R. G.; Baynes, J. W.; Hudson, B. G. Amadorins: Novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 257, 251-258.
- (24) Onorato, J. M.; Jenkins, A. J.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation reactions, also inhibits advanced lipoxidation reactions. Mechanism of action of pyridoxamine. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 21177-21184.
- (25) Martins, S. I. F. S.; Van Boeckel, M. A. J. S. Kinetics of the glucose/glycine Maillard reaction pathways: influences of pH and reactant initial concentrations. *Food Chem.* 2005, 92, 437-448.
- (26) Chetyrkin, S. V.; Zhang, W.; Hudson, B. G.; Serianni, A. S. Voziyan, P. A. Pyridoxamine protects proteins from functional damage by 3-deoxyglucosine: mechanism of action of pyridoxamine. *Biochem.* 2008, 47, 997-1006

3.3. Aislamiento y caracterización estructural de los aductos acrilamida-piridoxamina

En el trabajo anterior se constató que la piridoxamina era capaz de inhibir la formación de acrilamida de forma indirecta a través del atrapamiento de los intermediarios dicarbonílicos glicoxal y metilglicoxal. Sin embargo, también se ha descrito la formación de aductos de acrilamida como una manera eficiente de reducir los niveles de acrilamida, debido a su capacidad para reaccionar con reactivos nucleófilos mediante reacciones de adición. Por tanto, el objetivo de este trabajo es investigar si la piridoxamina es capaz de reaccionar también de forma directa con la acrilamida y formar aductos, como una posibilidad de mecanismo de inhibición adicional.

Se emplearon una serie de experimentos en sistemas modelo. Para ello, se calentó durante diferentes tiempos una mezcla semisólida de piridoxamina-acrilamida a 140 °C. Se observaron cuatro picos cromatográficos que fueron asignados como los aductos piridoxamina-acrilamida. Los dos aductos mayoritarios fueron seleccionados para el aislamiento mediante cromatografía flash y semipreparativa y para la caracterización estructural por diversas técnicas espectroscópicas (UV, fluorescencia, IR y RMN) así como espectrométricas (MS, MS/MS).

Los resultados permitieron concluir que la piridoxamina tiene la capacidad de reaccionar directamente con la acrilamida mediante una adición de Michael, planteándose un mecanismo de reacción.

En una etapa posterior, se ha confirmado la inhibición de acrilamida y consiguiente formación de estos aductos en muestras de galletas fortificadas con piridoxamina.

Este artículo ha sido publicado en la revista *Chemical Research in Toxicology* bajo el título ***“Isolation and structural characterization of acrylamide-pyridoxamine adducts”***.

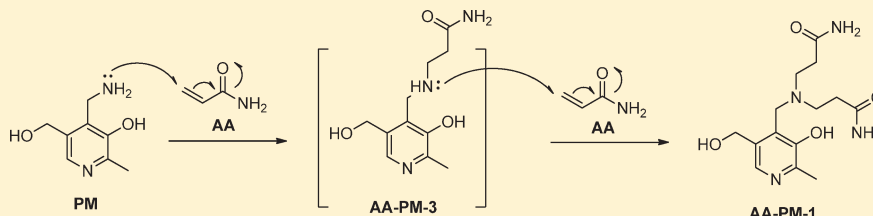
Isolation and Structural Characterization of Acrylamide–Pyridoxamine Adducts

Gema Arribas-Lorenzo,[†] Mercedes Pintado-Sierra,[‡] and Francisco J. Morales^{*,†}

[†]Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, 28040, and [‡]Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid, 28049, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

ABSTRACT: Pyridoxamine (PM) is an effective inhibitor of the formation of the carcinogen acrylamide (AA) from its precursors in low-moisture model systems. Although AA is widely assumed to act by scavenging carbonyl compounds, no alternative pathways have to date been explored. In this work, we found AA to

directly react with PM in a low-moisture acrylamide–pyridoxamine model system heated at 140 °C for up to 40 min. The reaction products gave four major chromatographic peaks that were assigned to acrylamide–pyridoxamine adducts. Two of the adducts (AA–PM-1 and AA–PM-3) were selected for isolation and structural characterization with various spectroscopic (UV, fluorescence, IR, and NMR) and mass spectrometric techniques (MS, MS/MS). As shown by the proposed reaction scheme, PM can directly react with AA via Michael addition. The reaction involves a nucleophilic attack of the PM amine group on AA (an α,β -unsaturated carbonyl compound) to give adduct AA–PM-3, which was identified as 3-(((3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl)methyl)amino)propanamide. However, AA–PM-3 further reacts with any additional AA present in the medium to give adduct AA–PM-1 identified as 3,3'-(((3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl)methyl)azanediyldipropionamide). The time courses of these adduct formation reactions were studied in cookies supplemented with PM, where AA–PM-3 was found to be the predominant structure.



INTRODUCTION

Acrylamide (AA) is a processing contaminant naturally formed during thermal treatment of foods.^{1,2} The widespread ubiquity of AA in the diet has raised worldwide concern about its potential health hazards, but their nature and severity remain a matter of debate.^{3,4} The Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) concluded that the margins of exposure for average and high consumers were very low for a compound that is both genotoxic and carcinogenic, and hence potentially hazardous to human health.⁵ The fact that acrylamide is present in an extensive range of widely consumed foods such as potato chips, crispbread, and biscuits has greatly promoted research aimed at unraveling its formation mechanism⁶ and developing strategies to decrease human exposure as summarized in the CIA Acrylamide Toolbox of 2009.⁷

Acrylamide is believed to form via a Maillard reaction involving reducing sugars and asparagine; however, dicarbonyl compounds and various lipid oxidation products^{8–11} are known to boost the reaction rate under specific conditions.² Some studies have shown that AA formation can be minimized by adding nucleophiles such as cysteine, lysine, or glycine to foods.^{2,12} Recently, the formation of amino acid–acrylamide adducts was shown to efficiently reduce AA levels^{13–15} by virtue of AA, an α,β -unsaturated carbonyl compound, being able to directly react with nucleophiles via Michael-type addition reactions.

Pyridoxamine (PM) is a well-known inhibitor of the Maillard reaction capable of reducing the formation of advanced glycation end-products (AGEs) both *in vivo* and *in vitro*.^{16,17} On the basis of these properties, PM is used as a pharmacological agent for the treatment of multifactorial chronic diseases such as diabetes and atherosclerosis complications, where it acts by inhibiting the Maillard reaction and reducing the pathogenicity of carbonyl compounds.^{18,19} In previous work, we found PM to have a beneficial effect derived from its ability to reduce the presence of acrylamide in glucose/asparagine model systems by up to 51%;²⁰ we ascribed the effect to PM indirectly inhibiting AA formation by scavenging major promoters such as glyoxal and methylglyoxal. Zeng et al.²¹ confirmed these results and found PM and other vitamins to reduce acrylamide levels in chemical models and fried snack products by up to 50%; they proposed no specific mechanism for the inhibitory effect of PM, however. Later, Cheng et al.²² stated that the flavonoid naringenin inhibits acrylamide formation by directly reacting with its precursors to form other derivatives. Also, a recent study showed niacin to efficiently trap acrylamide and form a stable adduct: 1-propionamide-3-carboxypyridinium.²³

The purpose of this work was to investigate the mechanisms involved in PM–AA interaction and identify, for the first time, its

Received: August 30, 2010

Published: February 14, 2011

major products. The results provide useful new insight into acrylamide reduction strategies.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. Acrylamide (99%) was supplied by Sigma (St. Louis, MO, USA). PM•(HCl) was purchased from Fluka Chemicals (Madrid, Spain) and ultrapure water obtained from a Milli-Q apparatus from Millipore (Bedford, MA, USA). Oasis-HLB cartridges (30 mg, 1 mL) were supplied by Waters (Milford, MA, USA). [$^{13}\text{C}_3$]-Acrylamide in 99% isotopic purity was obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA), and HPLC-grade solvents and other reagents were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Wheat flour, salt, sunflower oil, and sugar were obtained from local producers. Flash column chromatography was carried out on silica gel 60, 230–400 mesh ASTM from Merck (Darmstadt, Germany), and TLC was performed on silica gel precoated aluminum foils, 60F 254, 0.25 mm, also from Merck.

PM–AA Reaction in Model Systems. Acrylamide (141 μmol) and pyridoxamine (28 μmol) were dissolved in 100 μL of 0.1 M sodium phosphate buffer at pH 6.8 and heated in tightly closed Pyrex vacuum hydrolysis tubes (10 cm \times 0.9 mm) at 140 $^{\circ}\text{C}$ for 0, 5, 10, 20, 30, or 40 min in an oil bath. Solutions containing AA or PM alone were processed simultaneously and used as controls. After heating for the preset times, the samples were immediately cooled in iced water to stop the reaction. Then, they were supplied with 1 mL of distilled water and stored at –20 $^{\circ}\text{C}$. All runs were done in duplicate.

The effect of the reactant concentration was examined by heating an amount of AA of 141 μmol in the presence of variable amounts of PM (141, 28, 14, 3, 1, and 0 μmol) in 100 μL of 0.1 M sodium phosphate buffer at pH 6.8. After heating at 140 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min, the samples were cooled in ice–water and treated like the previous ones.

Cookie Preparation. The dough used as control was prepared from salt (0.6%, w/w), sodium bicarbonate (0.7%, w/w), sugar (20.4%, w/w), sunflower oil (14.0%, w/w), deionized water (14.6%, w/w), and wheat flour (49.7%, w/w), and supplemented with PM at two different concentrations (0.5% and 1% w/w) which were dissolved in the water used to make the dough. Once ready, the dough was rolled to form disks with 2 mm thick and 5 cm in diameter that were baked in duplicate in a UNE 400 oven from Memmert GmbH (Heilbronn, Germany) without forced air circulation at 190 $^{\circ}\text{C}$ for 9–17 min. The baking temperature was digitally controlled and monitored via the software Celsius 2007 v. 8.0, also from Memmert GmbH.

Acrylamide Analysis. Acrylamide in the reaction mixtures was determined by LC with diode array detection (DAD). To this end, samples were centrifuged at 9000g for 5 min, filtered to obtain a clear supernatant, and diluted with distilled water as required. Acrylamide was quantified on an LC system from Shimadzu (Kyoto, Japan) equipped with an LC-20AD pump, an SIL-10ADvp autosampler, a CTO-10ASVP oven, and an SPD-M20A diode array detector. Chromatographic separations were performed on an Inertsil ODS-3 column (250 \times 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was 100% ultrapure water and circulated in the isocratic mode at a flow rate of 0.6 mL/min at 32 $^{\circ}\text{C}$. Acrylamide was detected at 210 nm and eluted at 10.7 min. Calibration was done over the range 5–1000 $\mu\text{g/L}$ and the limit of quantitation set at 5 $\mu\text{g/L}$. Within- and between-day precision, expressed as relative standard deviation (RSD) were 2–10% and 2%, respectively, and recoveries ranged from 84 to 109%, with RSD \leq 6%. Acrylamide in the cookies was extracted and analyzed by LC-ESI-MS, using the method of Arribas-Lorenzo et al.²⁰

Determination of PM and Target AA–PM Reaction Products. Pyridoxamine was quantified by LC-fluorescence spectroscopy according to Arribas-Lorenzo and Morales.²⁰ Samples from the reaction mixtures and isolated fractions were passed through a nylon filter of 0.45 μm pore size and a 10 μL aliquot of each injected into a Kromasil

column (250 mm \times 4 mm, 5 μm) from Sugerlabor (Madrid, Spain). The samples were appropriately diluted with distilled water and eluted in a gradient consisting of 10 mM heptafluorobutyric acid (HFBA) in water (phase A) and 100% acetonitrile (phase B) at 1 mL/min. The column was equilibrated in 95% phase A and 5% phase B. The elution program was as follows: time 0–1 min, 5% B; time 10 min, 20% B; time 11 min, 40% B; time 12 min 40% B; time 20 min, 5% B; and time 45 min, 0% B. Chromatograms were acquired at an excitation wavelength of 290 nm and an emission wavelength of 395 nm. Calibration was done over the range 10–1000 ng/mL and the limit of quantitation set at 50 ng/mL. Precision was better than 3% and recoveries ranged from 95% to 105%. In addition to fluorescence measurements, a DAD detector with a reference wavelength of 290 nm was used to identify AA–PM reaction products. A Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with an LC-20AD pump, an SIL-10ADvp autosampler, a CTO-10ASVP oven, an SPD-M20A diode array detector, and an RF-10AXL fluorescence detector controlled by a CBM-20A communication bus module was used for this purpose.

Isolation and Purification of AA–PM Adducts. Obtaining adequate amounts of some AA–PM adducts for their structural characterization required scaling up the reaction model to 1 g of acrylamide and 0.72 g of pyridoxamine. The mixture was dissolved in 100 mL of 0.1 M sodium phosphate buffer at pH 6.8, heated at 140 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min and then rapidly cooled down and filtered for LC analysis. Two semipreparative chromatographic methods were used. In the flash chromatography method, the reaction mixture was neutralized with NaHCO_3 and washed with ethyl acetate (3 \times 10 mL) to remove residual acrylamide. The solvent (water) was removed from the aqueous layer under reduced pressure and the reaction crude dissolved in methanol. Any inorganic salts formed in the neutralization reaction were removed by filtration, as was methanol under reduced pressure. The resulting crude was purified, first by flash column chromatography (ethyl acetate/ethanol gradient from 8/2 to 5/5) and then by preparative TLC with methanol as eluent, which allowed two purified fractions to be obtained. Reaction mixtures were also chromatographed over a semipreparative column (Spherisorb ODS-2, 25 \times 1 cm, 5 μm , Tecknokra, Barcelona, Spain) at a flow rate of 2.2 mL/min, using two different mobile phase compositions. One consisted of (A) 10 mM HFBA in water (95:5) and (B) acetonitrile. The elution program was as follows: time 0–1 min, 5% B; time 10 min, 20% B; time 11 min, 40% B; time 12 min 40% B; time 20 min, 5% B; and time 45 min, 0% B. The other eluant consisted of 0.1% aqueous trifluoroacetic acid (TFA) and was used in the isocratic mode. In both procedures, data were acquired by using the DAD detector (190–500 nm) at an excitation wavelength of 290 nm and an emission wavelength of 395 nm. The chromatographic peaks corresponding to the target compounds were collected from repeated injections.

Mass Spectrometry. The isolated AA–PM adducts were dissolved in water before injection into the mass spectrometer. Samples were then directly infused at a rate of 0.2 $\mu\text{L/min}$ and data acquired for 3 min. Analyses were done on a Varian 1200 L triple quadrupole mass spectrometer equipped with an atmospheric pressure ionization (API) source using electrospray ionization (ESI) (Walnut Creek, CA, USA). The operating conditions were as follows: drying gas pressure, 30 psi; nebulizing pressure, 60 psi; drying gas temperature, 400 $^{\circ}\text{C}$; and API housing temperature, 60 $^{\circ}\text{C}$. The capillary voltage was set at 40 V. Nitrogen was used as both desolvation cone gas and nebulization gas, and argon at a collision cell pressure of 2.1×10^{-9} Torr was employed as collision gas. The mass spectrometer was programmed to acquire a full mass spectrum and an MS/MS spectrum of the most intense ion, using variable collision energies for each transition. Spectra were recorded in the positive ion mode over the m/z range 10–600.

High-resolution mass spectrometry was performed on an Agilent 1200 series LC system comprising a quaternary pump with integrated

degasser, thermostatted autosampler, thermostatted column compartment, and diode array detector, and coupled to an Agilent 6530 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-ToF) LC/MS with ESI-Jet Stream Technology (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany). A Zorbax Extend C18 RRHT column (2.1×50 mm, $1.8 \mu\text{m}$, Agilent Technologies, Waldbroon, Germany) was used. Each sample ($10 \mu\text{L}$) was injected and separated isocratically by using a mobile phase consisting of 90% water and 10% acetonitrile, both containing 0.1% formic acid, at a flow rate of 0.4 mL/min . Identification and characterization were done by MS and MS/MS. The Q-ToF acquisition conditions were as follows: 4 GHz, mass range $<1700 m/z$, positive polarity, drying gas volume and temperature $8 \text{ L}/300^\circ\text{C}$, sheath gas volume and temperature $11 \text{ L}/350^\circ\text{C}$, nebulizer pressure 45 psi, cap voltage 3500 V, nozzle voltage 1000 V, and fragmentor voltage 100 V. MS/MS runs for the target adducts were done with collision energies from 5 to 75 V. ToF-MS resolution was $>10,000 (m/z 118)$ with a mass error of 2 ppm. Data acquisition and qualitative analysis were performed with the aid of MassHunter Workstation Software (versions B.02.01 and B.03.01, respectively) from Agilent Technologies (Waldbroon, Germany).

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR). ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker 200 spectrometer (Ettlingen, Germany), using D_2O solutions at room temperature. Chemical shifts are given in parts per million (ppm) and referred to the peak for a drop of added methanol (δ 3.34 for ^1H NMR and δ 49.5 for ^{13}C NMR) as internal reference. Singlets are denoted by s and triplets by t.

IR Spectra. IR spectra were recorded over the wavenumber range $4000\text{--}200 \text{ cm}^{-1}$ on a Bruker IFS 66v/S spectrophotometer (Ettlingen, Germany), using potassium bromide disks.

Absorption Spectra. UV-vis spectra for the reaction mixtures were recorded by using a plate reader (BioTek Instruments, VT) furnished with a quartz 96-well microplate (Biogen Cientifica, Madrid, Spain). All samples were diluted prior to measurement.

Fluorescence Spectra. Fluorescence emission and excitation spectra were recorded on an SMF-25 fluorescence spectrofluorimeter (Kontron Instruments, Milan, Italy), using quartzglass cuvettes (QS-1000 Suprasil, Hellma GmbH & Co, Germany) of 1 cm light path.

3,3'-(((3-Hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl)methyl)azanediyl) dipropanamide (AA-PM-1). ^1H NMR (200 MHz, D_2O): δ 2.38 (s, 3 H, CH_3), 2.55 (t, 4 H, $J = 6.9 \text{ Hz}$, $2 \times \text{CH}_2\text{CO}$), 2.91 (t, 4 H, $J = 6.9 \text{ Hz}$, $2 \times \text{CH}_2\text{-N}$), 3.98 (s, 2 H, Ar- $\text{CH}_2\text{-N}$), 4.61 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 7.74 (s, 1 H, Ar-H), (OH, NH not observed) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O): δ 18.0 (CH_3), 32.6 (CH_2CO), 49.8 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 51.7 (Ar- $\text{CH}_2\text{-N}$), 60.2 (CH_2OH), 131.6, 133.9, 135.6, 147.6, 149.0 (C-Ar), 177.6 (CO) ppm. MS (ESI): m/z 311 [nominal mass, $[\text{M} + \text{H}]^+$]. Q-ToF: m/z 310.1627 (calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$, 310.1641). IR (KBr): $3500\text{--}3100$ (s, $\nu_{\text{OH, NH}}$), 2930 (w, ν_{CH}), 1675 (s, $\nu_{\text{C=O}}$), 1572, 1414 (s, $\nu_{\text{C=C, C-C, C=N}}$), 1106 (m, $\nu_{\text{C-OH, C-N}}$), 652 (w), 469 (w) cm^{-1} . UV $\lambda_{\text{max}} = 285 \text{ nm}$. Fluorescence: max excitation 329 nm (at $\lambda_{\text{em}} = 395 \text{ nm}$); max emission 370 (at $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$). TLC solvent system: methanol, $R_f = 0.5$.

3-(((3-Hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl)-methyl)amino) propanamide (AA-PM-3). ^1H NMR (200 MHz, D_2O): δ 2.32 (s, 3 H, CH_3), 2.54 (t, 2 H, $J = 6.4 \text{ Hz}$, CH_2CO), 3.00 (t, 2 H, $J = 6.4 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{-N}$), 4.00 (s, 2 H, Ar- $\text{CH}_2\text{-N}$), 4.57 (s, 2 H, Ar- $\text{CH}_2\text{-OH}$), 7.53 (s, 1 H, Ar-H), (OH, NH not observed) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O): δ 18.6 (CH_3), 33.9 (CH_2CO), 43.8 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 44.9 (Ar- $\text{CH}_2\text{-N}$), 60.4 (CH_2OH), 132.2, 133.4, 133.7, 147.0, 150.0 (C-Ar), 177.1 (CO) ppm. MS (LC-MS): 240 [nominal mass, $[\text{M} + \text{H}]^+$]. Q-ToF: m/z 239.1265 (calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$, 239.1269). IR (KBr): $3500\text{--}3100$ (s, $\nu_{\text{OH, NH}}$), 2956, 2927 (w, ν_{CH}), 1670 (s, $\nu_{\text{C=O}}$), 1569, 1444, 1418 (s, $\nu_{\text{C=C, C-C, C=N}}$), 1130 (s, $\nu_{\text{C-OH, C-N}}$), 618 (w), 472 (w) cm^{-1} . UV $\lambda_{\text{max}} = 307 \text{ nm}$. Fluorescence: max excitation 317 nm

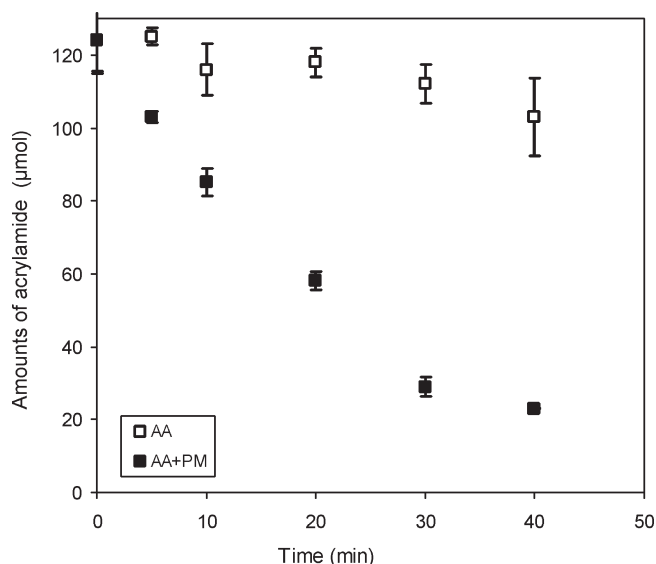


Figure 1. Acrylamide disappearance from the reaction systems on heating at 140°C in the presence (■) and absence (□) of pyridoxamine.

(at $\lambda_{\text{em}} = 395 \text{ nm}$); max emission 370 nm (at $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$). TLC solvent system: methanol, $R_f = 0.2$.

Statistical Analysis. The results given are the means of two or more independent determinations. Differences with $P < 0.05$ were considered to be statistically significant as per Tukey's test. Microcal Origin, version 7.5, from Origin Lab Corp. (North Hampton, MA, USA) was used for statistical computations.

RESULTS AND DISCUSSION

In a previous study, our group concluded that PM is a potent scavenger of dicarbonyls, which are precursors in the formation of AA.²⁰ Therefore, PM is an effective inhibitor of AA formation via an indirect mechanism. No alternative, direct mechanism for the interaction between PM and AA was considered in the previous study, however.

Acrylamide Disappearance from AA-PM Model Systems.

As can be seen from Figure 1, the rate of disappearance of AA in the presence of PM in phosphate buffer increased as heating progressed, simultaneously with the appearance of new peaks in the chromatographic profile for acrylamide. These results suggest that PM may react with AA in a direct manner to form specific reaction products. However, heating acrylamide in the phosphate buffer used as control caused its concentration to decrease by nearly 15% after a long enough time even though evaporation was negligible. This is consistent with reported evidence of residual acrylamide polymerization in the presence of phosphate buffer.^{15,24}

The effect of the mole ratio of acrylamide to pyridoxamine was also studied and AA found to disappear in proportion to the amount of PM present in the reaction medium. Acrylamide disappearance peaked at $92 \pm 3\%$ at a mole ratio of 1:1 ($141 \mu\text{mol}$, AA/PM). The next step was thus to identify and characterize the main products of the reaction between AA and PM.

AA-PM Adduct Formation. Mixtures of AA and PM in 0.1 M sodium phosphate buffer at pH 6.8 at 140°C were allowed to react for 0, 5, 10, 20, 30, or 40 min and then analyzed by LC with fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 395 \text{ nm}$) and diode array detection (290 nm, scan range 190–500 nm). Since AA-PM adducts were expected to share the fluorescence properties of

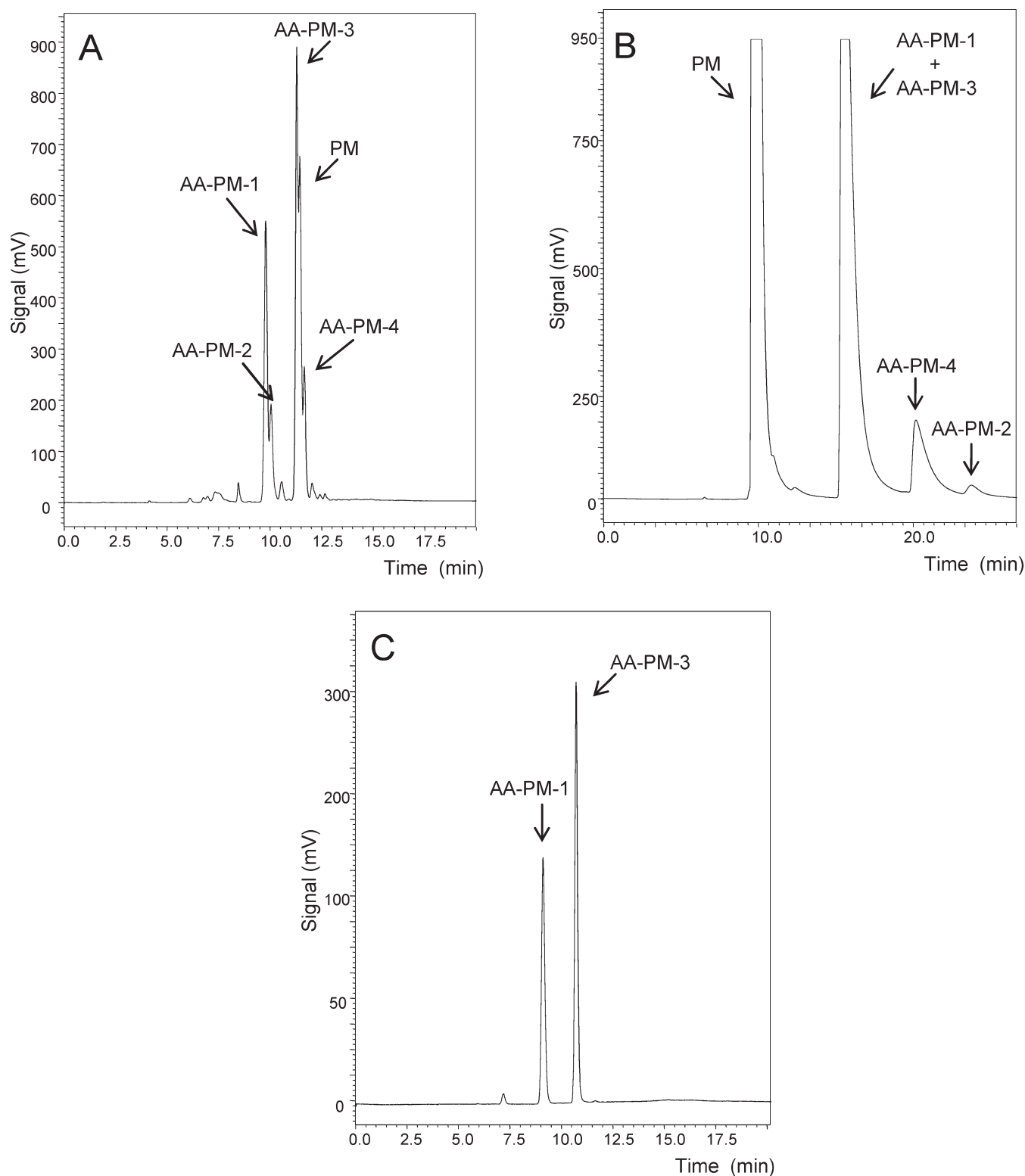


Figure 2. LC chromatograms with fluorescence detection ($\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 395 \text{ nm}$) for AA-PM reaction mixtures ($140^\circ\text{C}/20 \text{ min}$). (A) Chromatographic profile for AA-PM samples eluted with HFBA (10 mM); (B) elution with 0.1% TFA under semipreparative conditions; (C) elution of AA-PM-1 and AA-PM-3 with HFBA (10 mM). For chromatographic conditions and description, see text.

PM-derived structures, the time course of the reaction was monitored fluorimetrically. Figure 2A shows a number of new peaks for the heated reaction mixtures in addition to those for PM. Four major peaks at different elution times were selected as

targets, namely, AA-PM-1 (9.7 min), AA-PM-2 (10.1 min), AA-PM-3 (11.0 min), and AA-PM-4 (12.2 min). These AA-PM adducts were detectable after only 5 min of reaction. However, the chromatographic profile was complicated by the

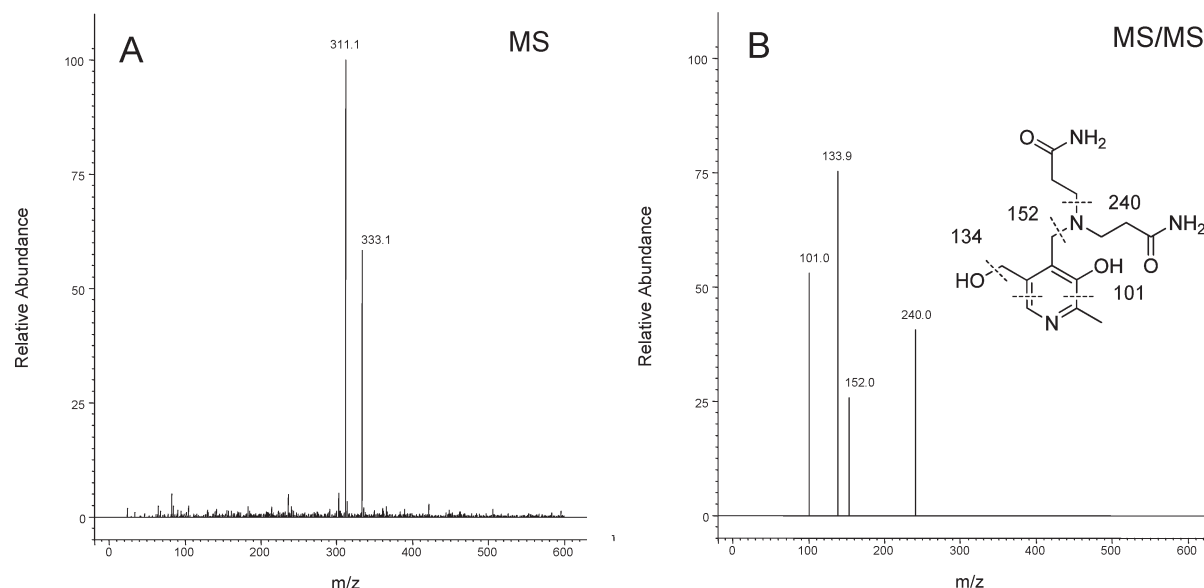


Figure 3. (A) Full (ESI positive) MS spectra for the chromatographic fractions corresponding to adduct AA-PM-1. (B) MS/MS spectra and their major fragments. MS/MS was performed on the peak at m/z 311.1.

appearance of other, minor peaks probably due to AA-PM adducts at different stages of chemical reorganization as heating was prolonged. Adducts AA-PM-3 and AA-PM-4 nearly coeluted with PM were unresolved at baseline and decreased with time.

Although unreacted pyridoxamine was detected at RT 11.8 min, neither pyridoxal nor pyridoxine was detected as degradation products. The kinetic study showed that the PM peak decreased as the AA-PM-1 and AA-PM-2 peaks increased during the first 20 min; beyond that point, however, both adduct peaks decreased as well (results not shown). Interestingly, the retention times for AA-PM-1 and AA-PM-2 were suggestive of decreased hydrophobicity relative to that of PM. Various strategies including altering the solvent composition, polarity, and gradient profile were tested in order to improve resolution between adducts. The best conditions for this purpose are described under Experimental Procedures.

Isolation and Purification of the Major AA-PM Adduct.

The next step was to isolate and purify the target reaction products (AA-PM adducts) chromatographically for structural elucidation. A 100 times more concentrated AA-PM reaction system was prepared in order to obtain large enough amounts of the adducts for structural elucidation. Initially, we focused on isolating AA-PM-1, which was obtained in large amounts and well-resolved from PM. Adduct purification was accomplished by semipreparative chromatography as described under Experimental Procedures.

The target peaks obtained by direct chromatographic separation of the reaction mixtures under semipreparative conditions with HBFA were unresolved at baseline, which precluded the collection of fractions. However, replacing HBFA with TFA as mobile phase provided four well-resolved peaks (Figure 2B). The peaks were collected and subsequently rechromatographed in HFBA, the results confirming that the first (RT 11 min) corresponded to unreacted PM, the second (RT 17.37 min) to a mixed fraction of AA-PM-1 and AA-PM-3, the third to AA-PM-4, and the fourth to AA-PM-2. Figure 2C testifies to the presence of AA-PM-1 and AA-PM-3 in the second peak

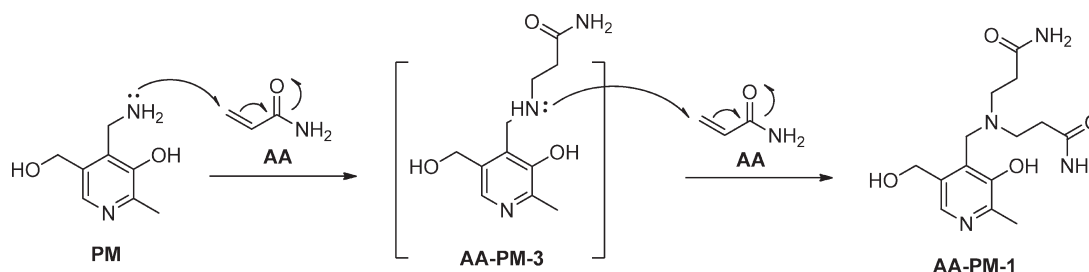
(RT 17.37 min) when chromatographed in HFBA. These two fractions were thus used for structural identification.

Structural Characterization of AA-PM Adducts. *Adduct 1 (AA-PM-1).* The electrospray ionization (ESI) mass spectrum in the positive ion mode exhibited two ion peaks at m/z 311 and 333 (Figure 3A) corresponding to the molecular ion $[M + H]^+$ and the adduct ion $[M + Na]^+$, with $M = 310$. The molecular weight coincided exactly with the combination of one pyridoxamine unit linked to two acrylamide molecules, which suggests that AA-PM-1 was a dimer-AA adduct of PM. Also, the MS/MS fragments in the QqQ mass spectrum exhibited product ion peaks at m/z 240, 152, 134, and 101, which can be ascribed to the loss of one acrylamide unit, a PM deamination product from the ion at m/z 240 as previously reported by Voziyan et al.,¹⁷ the loss of an alcohol group from the ion at m/z 152, and cleavage of a pyridoxamine ring or the loss of C_3H_3N from the ion at m/z 152 (Figure 3B). The exact mass of the product was determined by high-resolution MS to be 310.1627, which corresponds to $C_{14}H_{22}N_4O_4$. These results show that PM reacts in a direct manner with AA. The structure was subsequently confirmed by examining its 1H and ^{13}C NMR spectra. Thus, the 1H NMR spectrum exhibited two signals at δ 2.55 and 2.91 ppm consistent with the presence of CH_2CO and CH_2-N groups; in fact, the signals were triplet integration of which provided two groups each. The signals at δ 32.6 and 19.8 ppm in the ^{13}C NMR spectrum further confirmed the presence of these groups. The other peaks in the 1H and ^{13}C spectra corresponded to the PM backbone (Table 1).

On the basis of these results, two molecules of AA bound to the pyridoxine amine group. This suggests that the most likely reaction mechanism is 1,4-nucleophilic conjugate addition or Michael addition (Figure 4) of the amine group in pyridoxamine to the β carbon in acrylamide (an electrophilic site). Adduct AA-PM-1 absorbed maximally at 285 nm. As regards the fluorescence spectra, the profile for PM was identical with that for the emission scan ($\lambda_{em} = 290$ nm) but departed somehow from that for the excitation scan ($\lambda_{ex} = 395$ nm). The IR spectrum exhibited the typical absorption bands at $3500-3100\text{ cm}^{-1}$,

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR Assignments for Adduct AA–PM-1

group	^1H NMR (ppm)	^{13}C NMR (ppm)
CH_3	2.38 (s, 3 H, CH_3)	18.0
CH_2CO	2.55 (t, 4 H, $J = 6.9$ Hz, $2\times\text{CH}_2\text{CO}$)	32.6
CH_2N	2.91 (t, 4 H, $J = 6.9$ Hz, $2\times\text{CH}_2\text{-N}$)	49.8
$\text{Ar-CH}_2\text{-N}$	3.98 (s, 2 H, $\text{Ar-CH}_2\text{-N}$)	51.7
$\text{Ar-CH}_2\text{-OH}$	4.61 (s, 2 H, $\text{Ar-CH}_2\text{-OH}$)	60.2
Ar-CH	7.74 (s, 1 H, Ar-H)	131.6, 133.9, 135.6, 147.6, 149.0
CO		177.6

**Figure 4.** Proposed mechanism for the formation of adducts AA–PM-1 and AA–PM-3 in heated model systems of acrylamide and pyridoxamine.

with a broad stretching band indicating the presence of NH and OH groups, several strong bands at 1672 cm^{-1} corresponding to the carbonyl group of amides, and bands at 1575 and 1414 cm^{-1} due to the aromatic pyridine ring. The additional bands observed at 1105 cm^{-1} can be assigned to the presence of alcohol and amine/amide groups. On the basis of the foregoing, AA–PM-1 was confirmed to be 3,3'-(((3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl)methyl)azanediyl)dipropanamide.

Adduct 3. AA–PM-3 exhibited a molecular ion peak at m/z 240 $[M + H]^+$ in the MS spectrum (results not shown) corresponding to a molecular weight of 239. This suggests that it was also an AA–PM adduct but having a single acrylamide molecule linked to a pyridoxamine unit (i.e., a monomeric adduct). The MS/MS spectrum for this adduct exhibited signals for transition ions at m/z 169 (loss of acrylamide), 152 and 134 (same as for adduct 1), and 89. The exact mass was determined by high-resolution MS to be 239.1265, which corresponds to $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$. The fragmentation pattern was evaluated by high-resolution fragmentation from the parent ion as depicted in Figure 5. The ^1H and ^{13}C NMR conditions used are described under Experimental Procedures. Adduct AA–PM-3 exhibited minor differences in its UV–vis and fluorescence spectra from AA–PM-1, which suggests the presence of similar chromophores in both. AA–PM-3 may be an intermediate preceding the formation AA–PM-1 and hence disappearing as the latter forms. Structurally, AA–PM-3 was confirmed to be 3-(((3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl)methyl)amino)propanamide.

These results allow us to conclude that PM has the ability to directly react with AA in the reaction mixture. The process involves two consecutive Michael additions resulting from a nucleophilic attack of the amine group in pyridoxamine on the β carbon of acrylamide to give AA–PM-3, an intermediate which subsequently leads to AA–PM-1 as the major compound (Figure 4).

This result confirms the previous findings of other authors^{14,15,25} that acrylamide takes part in reactions yielding

addition products.^{14,15,25} As shown here, the main adduct formed in the reaction medium consists of two molecules of acrylamide linked to one of pyridoxamine and may be the result of the presence of excess AA in the reaction model. This, however, does not exclude the formation of other, minor adducts.

Regarding the potential of acrylamide adduct formation as a mitigation mechanism, it has been suggested that the formation of histidine–acrylamide adducts² involves alkylation reactions. In line with this statement, there is MS evidence that AA forms amino acid adducts by Michael addition,¹³ but the underlying reaction mechanism has not been investigated. Recently, some authors have identified and characterized adducts of AA with naringenin and niacin, which confirms that these compounds can trap acrylamide directly and reduce its presence as a result.^{22,23} There is, however, a lack of appropriate mechanistic studies.

Evolution of AA–PM Adducts in Cookies. In order to assess the significance of a direct reaction between AA and PM in food models, two different cookie doughs containing excess PM were baked at 190°C for variable lengths of time. Samples were extracted with water and analyzed for AA and PM. Adding 1% (w/w) PM to the dough reduced the amount of acrylamide in the cookies by 42%, 88%, 71%, 53%, and 49% after baking for 9, 11, 13, 15, and 17 min, respectively. A similar trend was observed with 0.5% (w/w) PM except that the inhibitory effect on AA was less marked. These results are consistent with those of Zeng et al.,²¹ who obtained nearly 60% inhibition by adding PM to food model systems before frying.

Figure 6 shows the time course of AA–PM-1 and AA–PM-3 formation during baking. AA–PM-3 was the predominant adduct in all cookies, with concentrations roughly 23-fold those of AA–PM-1. As previously observed in model systems, AA–PM-3 levels decreased after 11 min of baking. Interestingly, the higher was the concentration of AA–PM-3, the greater was the inhibitory effect of PM. Moreover, PM was consumed within a few minutes of baking in both control and PM-enriched cookies.

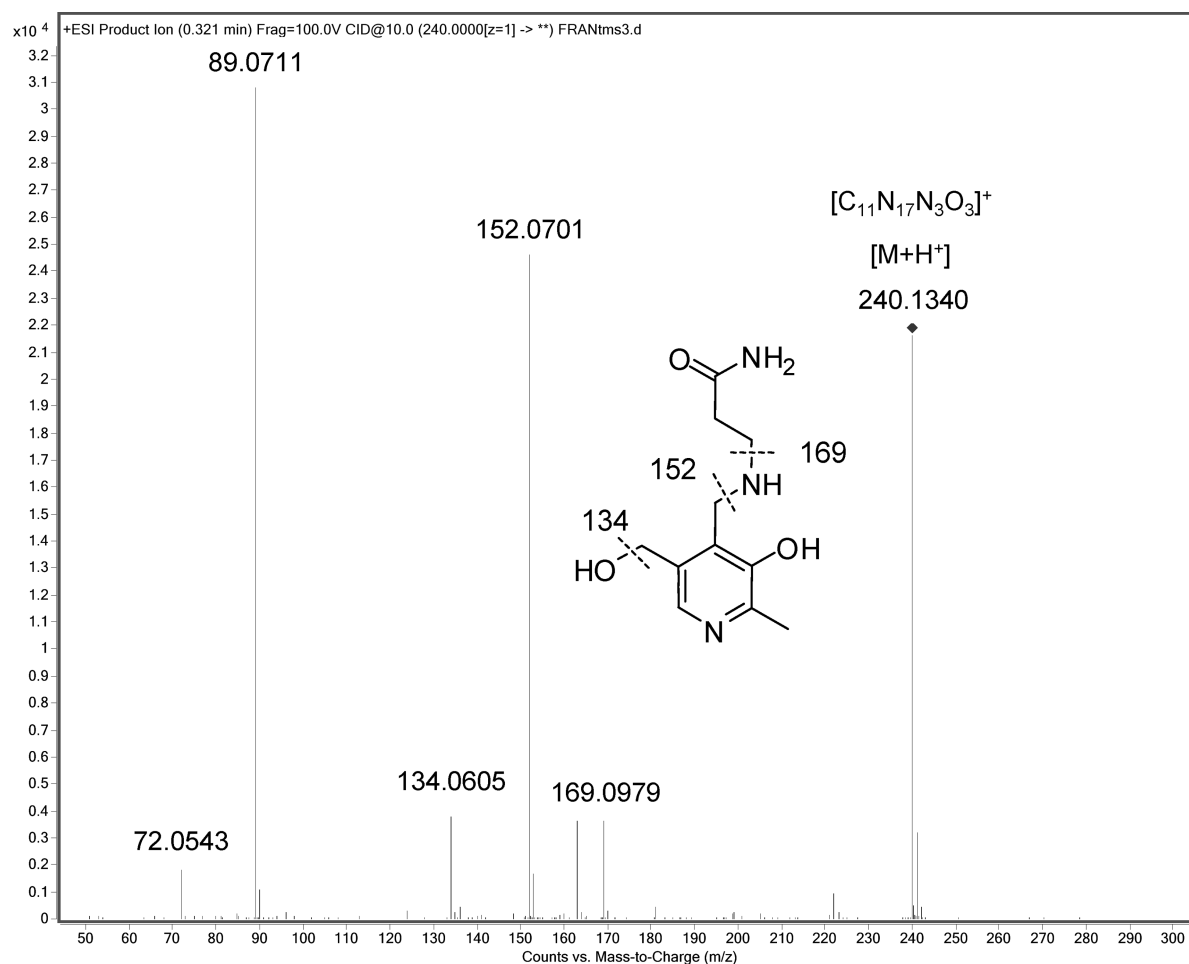


Figure 5. Fragmentation pattern and product ions for the ESI-high resolution mass spectrometry of the parent ion at m/z 240.13 (protonated AA-PM-3).

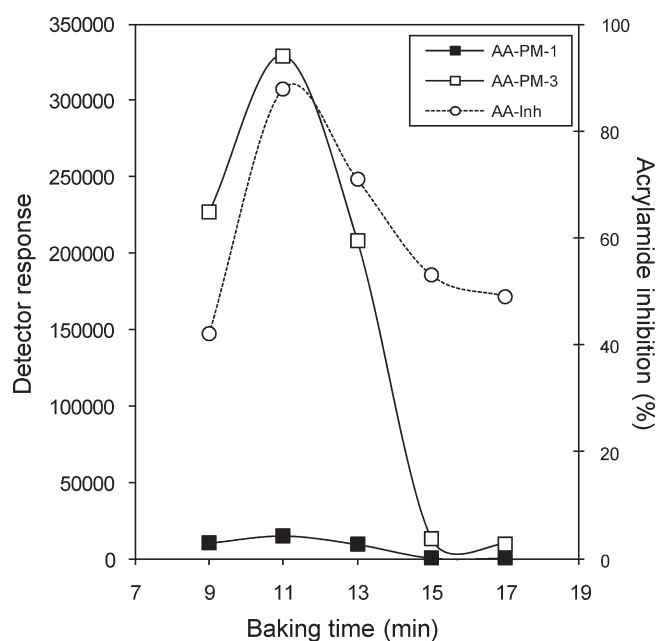


Figure 6. Time course of the formation of adducts AA-PM-1 and AA-PM-3 during baking. The dashed line (AA-Inh) on the second y-axis shows acrylamide inhibition (%).

In this work, two acrylamide-pyridoxamine covalent adducts (AA-PM-1 and AA-PM-3) were for the first time isolated, characterized, and identified as the products of a direct Michael addition reaction between AA and PM. Their formation kinetics in foods and other structures potentially involved in the process are currently under investigation. Ongoing research may provide further insight into potentially effective mechanisms for reducing acrylamide formation in foods.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición-ICTAN, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Jose Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain. Tel: +34 91 549 2300. Fax: +34 91 549 36 27. E-mail: fjmorales@ifc.csic.es.

Funding Sources

This research work was partly funded by Project ANALYSIC-II (S2009/AGR-1464) and Spain's Ministry of Science and Technology (AGL 2005-01735). G.A.-L. is grateful to the Conserjería de Educación de la Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo for the award of a Ph.D. grant.

ACKNOWLEDGMENT

Inmaculada Alvarez and Miguel A. Martinez are thanked for their technical assistance in the interpretation of the mass spectra. Laboratorio de Salud Pública (LSP) de Madrid is also gratefully acknowledged for access to its LC–MS/MS analysis facilities.

REFERENCES

- (1) Tareke, E. (2003) Identification and origin of potential background carcinogens: Endogenous isoprene and oxiranes, dietary acrylamide. Thesis, Department of Environmental Chemistry, Stockholm University.
- (2) Friedman, M. (2003) Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4504–4526.
- (3) Shipp, A., Lawrence, G., Gentry, R., McDonald, T., Bartow, H., Bounds, J., Macdonald, N., Clewell, H., Allen, B., and Van Landingham, C. (2006) Acrylamide: review of toxicity data and dose–response analyses for cancer and noncancer effects. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 481–608.
- (4) Parzefall, W. (2008) Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1360–1364.
- (5) FAO Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). (2005) Acrylamide, in *Summary and Conclusions of the Sixty-Fourth Meeting*, pp 7–17, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Rome, Italy.
- (6) Zhang, Y., Ren, Y. R., and Zhang, Y. (2009) New research developments on acrylamide: analytical chemistry, formation mechanism, and mitigation recipes. *Chem. Rev.* 109, 4375–4397.
- (7) CIAA. (2009) Confederation of the Food and Drink Industries in the UE. The CIAA acrylamide “toolbox”, Rev. 12, February, 2009, http://www.ciaa.be/documents/brochures/ac_toolbox_20090216.pdf.
- (8) Mottram, D. S., Bronislaw, L., and Wedzicha, A. T. D. (2002) Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 419, 448–449.
- (9) Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., Robert, M. C., and Riediker, S. (2002) Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 419, 449–450.
- (10) Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A., Rizzi, G. P., and Villagran, M. D. (2003) Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4782–4787.
- (11) Zamora, R., and Hidalgo, F. J. (2008) Contribution of lipid oxidation products to acrylamide formation in model systems. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6075–6080.
- (12) Rydberg, P., Eriksson, S., Tareke, E., Karlsson, P., Ehrenberg, L., and Törnqvist, M. (2003) Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7012–7018.
- (13) Koutsidis, G., Simons, S. P. J., Thong, Y. H., Haldoupis, Y., Mojica-Lazaro, J., Wedzicha, B. L., and Mottram, D. S. (2009) Investigations on the effect of amino acids on acrylamide, pyrazines, and Michael addition products in model systems. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9011–9015.
- (14) Zamora, R., Delgado, R. M., and Hidalgo, F. J. (2010) Model reactions of acrylamide with selected amino compounds. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1708–1713.
- (15) Adams, A., Hamdani, S., Lancker, F. V., Méjri, S., and Kimpe, N. D. (2010) Stability of acrylamide in model systems and its reactivity with selected nucleophiles. *Food Res. Int.* 43, 1517–1722.
- (16) Booth, A. A., Khalifah, R. G., Todd, P., and Hudson, B. G. (1997) In vitro kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs). Novel inhibition of post-Amadori glycation pathways. *J. Biol. Chem.* 272, 5430–5437.
- (17) Voziyan, P. A., Metz, T. O., Baynes, J. W., and Hudson, B. G. (2002) A post-Amadori inhibitor pyridoxamine also inhibits chemical modification of proteins by scavenging carbonyl intermediates of carbohydrate and lipid degradation. *J. Biol. Chem.* 277, 3397–3403.
- (18) Voziyan, P. A., and Hudson, B. G. (2005) Pyridoxamine: The many virtues of a Maillard reaction inhibitor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1043, 807–816.
- (19) Reddy, V. P., and Beyaz, A. (2006) Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discovery Today* 11, 646–654.
- (20) Arribas-Lorenzo, G., and Morales Francisco, J. (2009) Effect of pyridoxamine on acrylamide formation in a glucose/asparagines model system. *J. Agric. Food Chem.* 57, 901–909.
- (21) Zeng, X., Cheng, K. W., Jiang, Y., Lin, Z. X., Shi, J. J., Ou, S. Y., Chen, F., and Wang, M. (2009) Inhibition of acrylamide formation by vitamins in model reactions and fried potato strips. *Food Chem.* 116, 34–39.
- (22) Cheng, K. W., Zeng, X., Tang, Y. S., Wu, J. J., Liu, Z., Sze, K. Z., Chu, I. K., Chen, F., and Wang, M. (2009) Inhibitory mechanism of naringenin against carcinogenic acrylamide formation and non-enzymatic browning in Maillard model reactions. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 1483–1489.
- (23) Zeng, X., Kong, R. P. W., Cheng, K. W., Du, Y., Tang, Y. S., Chu, I. K., Lo, C., Sze, K. H., Chen, F., and Wang, M. (2010) Direct trapping of acrylamide as a key mechanism for Niacin's inhibitory activity in carcinogenic acrylamide formation. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 802–807.
- (24) Stadler, R. H., Robert, F., Riediker, S., Varga, N., Davidek, T., Devaud, S., Goldmann, T., Hau, J., and Blank, I. (2004) In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5550–5558.
- (25) Hidalgo, F. J., Delgado, R. M., and Zamora, R. (2010) Role of mercaptans on acrylamide elimination. *Food Chem.* 122, 596–601.

Capítulo 4

Estudios de estimación de ingesta

4.1. Contribución de las patatas fritas de aperitivo a la exposición dietética a acrilamida en la población española

El objetivo de este trabajo es presentar un estudio sobre el contenido de acrilamida en patatas fritas de aperitivo, estimar su ingesta y su contribución a las tasas de exposición de acrilamida en la población española.

La determinación cuantitativa de acrilamida de las 36 muestras que fueron recogidas en diferentes establecimientos de la Comunidad de Madrid, se llevó a cabo mediante el uso de LC-MS. El LOQ fue calculado en 25 µg/kg. El cálculo de la estimación de ingesta y la contribución de la misma se realizó a partir de dos bases de datos de consumo disponibles, MAPA 2007 y AESAN 2006. En base a los datos del consumo de alimentos publicados por el MAPA, y teniendo en cuenta el género, las edades, las comunidades autónomas y el nivel socioeconómico, se calculó la ingesta diaria total de acrilamida en la población total y se expresó como µg/kg peso corporal/día. El segundo estudio de estimación de ingesta se calculó a partir de los datos de consumo de la AESAN basados en FFQ entre individuos de 0 a 60 años, divididos por edades, durante 3 días consecutivos. Los contenidos de acrilamida en las patatas variaron entre 81 y 2622 µg/kg, con una media de 740 µg/kg.

La contribución media de las patatas a la exposición de acrilamida en la dieta española, partiendo de la base de datos del MAPA, fue de 0,042 µg/kg peso/día y de 0,117 µg/kg peso corporal/día para un escenario de riesgo (percentil 95%). Teniendo en cuenta la base de datos de la AESAN, la estimación media para los adultos (17-60 años) fue de 0,053 µg/kg peso corporal/día, mientras que para el caso de los niños (7-12 años) fue de 0,142 µg/kg peso corporal/día.

Se concluye que, las estimaciones promedios calculadas a partir de las dos bases de datos son muy similares y que la exposición de la población española a acrilamida a partir de las patatas fritas de aperitivo fue moderada cuando se comparó con otros países.

Los resultados de este estudio fueron utilizados de base científica en el informe EFSA 2010 sobre acrilamida "*Results on acrylamide levels in food from monitoring year 2008*" y EFSA 2011 "*Results on acrylamide levels in food from monitoring years 2007-2009 and exposure assessment*".

Este artículo ha sido publicado en la revista *Food Additives and Contaminants* bajo el título ***“Dietary exposure to acrylamide from potato crisps to the Spanish population”***.

Dietary exposure to acrylamide from potato crisps to the Spanish population

G. Arribas-Lorenzo and F.J. Morales*

Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto del Frío, Madrid, Spain

(Received 24 June 2008; final version received 14 September 2008)

Potato crisps are one of the food commodities that contribute most to overall dietary human exposure of acrylamide. This investigation has estimated the dietary exposure to acrylamide from potato crisps in the Spanish population. Sampling of potato crisps ($n = 36$) from 16 different producers were carried out in March 2008. An average level of $740 \mu\text{g kg}^{-1}$ (ranging from 81 to $2622 \mu\text{g kg}^{-1}$; minimum to maximum) and a median of $592 \mu\text{g kg}^{-1}$ were obtained. Acrylamide levels in marketed potato crisps have been significantly reduced (nearly to 50%) compared with a previous sampling performed 4 years earlier. The observed signal value (90th percentile) was $1377 \mu\text{g kg}^{-1}$ with 86% of the samples with acrylamide levels lower than $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$. Dietary exposure to acrylamide from potato crisp consumption in the total Spanish population was estimated to be $0.042 \mu\text{g kg}^{-1}$ body weight day^{-1} by using a deterministic approach based on the National consumption database. In a second study, dietary exposure (based on a 3-day food record) was determined to be $0.053 \mu\text{g kg}^{-1}$ body weight day^{-1} for the adult population (17–60 years) and $0.142 \mu\text{g kg}^{-1}$ body weight day^{-1} for children (7–12 years). The contribution of potato crisps to the estimated dietary acrylamide exposure of the Spanish population is moderate as compared with other European Member States.

Keywords: acrylamide; dietary intake; potato crisps; food contaminant

Introduction

Since the announcement of the presence of acrylamide in a wide range of foods (Tareke et al. 2002), a large number of studies have been published and summarized in reviews (Friedman 2003; Wenzl et al. 2003; Taeymans et al. 2004; Zhang et al. 2005) where basically acrylamide levels can be seen to depend on the raw materials, additives and processing parameters. Acrylamide is clearly genotoxic and carcinogenic in studies in animals and it causes increased tumour incidence at a variety of sites (International Agency for Research on Cancer (IARC) 1994; European Commission 2000). The IARC has classified ACRYLAMIDE as 'probably carcinogenic to humans (IARC Group 2A)'. The margin of exposure (MOE) is calculated by dividing the toxicity estimate from animal experiments by the estimated intake from food. Consequently, the lower the MOE, the greater is the public health concern. The MOEs were thus calculated to be 300 for the general population and just 75 for high consumers, including children. It is concluded that acrylamide in food is a potential public health hazard (Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO) 2005). The Scientific Committee of the European Food Safety Authority (EFSA) (2005),

which also endorses a MOE approach for compounds that are both carcinogenic and genotoxic, is of the view that a MOE of 10,000 or larger would be of low concern from a public health point of view and might be considered as a low priority for risk-management actions (HEATOX project, final report, April 2007). Toxic effects have been evaluated by the IARC (1994), World Health Organization/Joint Expert Committee on Food Additives (WHO/JECFA) (2005), reported in special issues (i.e. *Mutation Research* 2005), and its nutritional risk evaluated (Alexander 2006). A comprehensive review of acrylamide toxicity including mechanisms and risk assessment has recently appeared (Shipp et al. 2006; Parzefall 2008). Lastly, EFSA experts meeting on acrylamide (on 22–23 May in Tabiano, Italy) agreed to maintain the level of concern and to revise the situation in 2009 with new epidemiological data.

Potato products, such as crisps and French fries, are among the major contributors to the acrylamide daily intake, especially for children and teenagers (Wilson et al. 2006). Many studies have been accomplished to find strategies to minimize the levels of acrylamide, such as controlling the levels of reducing sugars in fresh tubers (Amrein et al. 2004; Matthäus et al. 2004), agronomical factors (Noti et al. 2003),

*Corresponding author. Email: fjmorales@if.csic.es

applying appropriate storage conditions (De Wilde et al. 2005), modifying soaking or blanking (Pedreschi et al. 2004), reducing frying temperature and time (Gertz and Klostermann 2002; Kita et al. 2004; Franke et al. 2005), and the addition of additives (Mestdagh et al. 2008) or cations (Gökmen and Şenyuva 2007). Alternatives to traditional frying such as vacuum frying (Granda et al. 2004) or combined pre-treatment by microwave heating (Erdogdu et al. 2007) or pre-frying (Pedreschi et al. 2007) have been proposed. The subject has been recently reviewed by Morales et al. (2008).

The JECFA estimated that the major contributing foods to total human exposure to acrylamide for most countries are potato chips (French fries, 16–30%), potato crisps (chips, 6–46%), coffee (13–39%), pastry and sweet biscuits (cookies, 10–20%), bread, rolls and toast (10–30%) and others (<10%). It concluded that based on national estimates, an intake of acrylamide of $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ body weight day^{-1} could be taken to be representative as the average for the general population and that an intake of $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ body weight day^{-1} could be taken to represent consumers with a high intake, including children. Estimating consumer exposure to acrylamide is a high priority for governments and industry alike where new exposure models have been recently developed that provide estimates of exposure of typical consumers and extreme consumers as well (Dybing et al. 2005).

In 2007, the European Commission (2007) made recommendations to monitor levels of acrylamide in certain food categories. These data will be compiled by Member States and reported to EFSA on a yearly basis for the next three years. Activities have not been equal across the European Union since overall dietary exposure has only been estimated for a certain numbers of Member States. In Spain, like many other Mediterranean countries, estimation has not yet been undertaken. It might be anticipated that there will be considerable differences between European Union countries due to differences in food consumption habits, including traditional foods.

Given the popularity of potato crisps, particularly among younger age groups, it is important to assess the daily intake of acrylamide from crisps in the Spanish diet. In parallel it is also relevant to obtain a picture of the current situation and monitoring progress in minimization strategies applied at the industrial level and to compare the intake with other European Union Member States before a further decision on risk management. This investigation presents a survey on commercial potato crisps in Spain and its contribution to the daily intake of acrylamide based on two exposure models as a comprehensive step to afford a precise study in the future by Spanish Administration bodies.

Materials and methods

Chemicals

All chemical used were of an analytical grade and obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), unless mentioned otherwise. $^{13}\text{C}_3$ -acrylamide (isotopic purity = 99%) was from Cambridge Isotope Labs (Andover, MA, USA). Oasis-HLB cartridges (30 mg, 1 ml) were from Waters (Milford, MA, USA).

Samples

Experiments were conducted with a series of commercial potato chips (36 brands from 16 producers) randomly purchased from different supermarkets between 10 and 18 March 2008. In this period stored potatoes were likely used by producers. Samples from the same brand containing different flavourings and/or added spices were not included in the sampling since frying variables and raw material should be similar. Samples (200–500 g) were mixed and thinly sliced to assure a homogeneous distribution of potential hot-spots. A portion (200 g) was distributed in four containers and stored under vacuum and light protected at 4°C until analysis.

LC-ESI-MS determination of acrylamide

Sample preparation as described by Şenyuva and Gökmen (2006) was used with minor modifications. A finely ground sample (0.450 g) was then weighed into a 10 ml centrifuge tube. The sample was spiked with 100 μl $^{13}\text{C}_3$ -labelled acrylamide ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) for recovery, and 5 ml of Milli-Q water were added. The mixture was then vortexed, kept for 5 min at room temperature and subsequently homogenized for 1 min (Ultraturrax). Then, 750 μl Carrez I and 750 μl Carrez II solution were added, vortexed and left to stand for 10 min. Tubes were centrifuged at 5000 rpm for 15 min at 4°C. The clear supernatant (1 ml) was clarified onto a pre-conditioned HLB cartridge. The first drops were discharged and the rest of the eluate was collected in amberlite vials for analysis.

Liquid chromatography-electrospray ionization-single quadrupole mass spectrometry (LC-ESI-MS) analyses were performed as described by Rufian-Henares et al. (2007) with minor modifications (Morales and Arribas-Lorenzo 2008) using an Agilent 1100 high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Waldbronn, Germany) consisting of a quaternary pump, an autosampler and a temperature-controlled column oven, coupled to an Agilent 1100 MS detector equipped with an electrospray ionization interface. The analytical separation was performed on an Inertsil ODS-3 column ($250 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) using an isocratic mixture of

0.2% aqueous solution of formic acid at a flow rate of 0.6 ml min^{-1} at 25°C . Data acquisition was performed, with a delay time of 8 min, in a selected ion-monitoring (SIM) mode using the following interface parameters: a drying gas (N_2 , 100 psig) flow of 121 min^{-1} , nebulizer pressure of 45 psig, drying gas temperatures of 350°C , a capillary voltage of 3 kV and a fragmenter voltage of 70 eV. Monitored ions were $72.1 m/z$ for acrylamide and $75.1 m/z$ for $^{13}\text{C}_3$ -labelled acrylamide. An acrylamide calibration curve was built in the range of $2\text{--}100 \mu\text{g l}^{-1}$ and a limit of quantification was determined to be $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ for potato crisps. The method was in-house validated for linearity, precision and recovery. Furthermore, the accuracy was recently demonstrated for potato crisps in an interlaboratory comparison study launched by Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), yielding a z -score of -0.5 . Precision (reproducibility) was lower than 12% and recovery was between 84 and 109%. The analyses are integrated within the scope of a certified laboratory controlled by AENOR (the Spanish Association for Standardization and Certification).

Food consumption data

In order to calculate the dietary intake of acrylamide from potato crisps, two different food consumption data were used. A first exposure study was carried out from the Spanish National Agricultural, Fishing and Food Administration (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA)) based on a yearly consumption database. It is a food survey annually published (MAPA 2007). This is the most recent measurement of dietary consumption in Spain at a national level. In this survey data were collected from 8240 interviews to non-institutionalized households and 898 interviews to restaurants, catering services, and institutions (hospitals, public schools, penitentiaries, etc.), covering the year 2006. The statistical universe of the study compiled a balanced, representative and stratified probability sample of the Spanish population taking into account gender, ages, regions, socio-economic status, among others. An average body weight of 70 kg was used to estimate the total daily intake of acrylamide to the total population and expressed as $\mu\text{g kg}^{-1}$ body weight day^{-1} . A second exposure study was calculated from food consumption data survey from the National Food Safety and Nutrition Agency in Spain (Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESA) 2006). This study was elaborated in 2003 with Food Frequency Questionnaires over 1963 subjects from zero to 60 years grouped in six age levels (>1 , 1 to ≤ 2 , 2 to ≤ 7 , 7 to ≤ 12 , 12 to ≤ 17 , and >17 years) in three consecutive days.

Statistical analysis

Analyses were performed using Statgraphics Plus, version 5.1, 2001 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA). At least two independent analyses were carried out per sample.

Results and discussion

Thirty-six classical potato chips from 16 different producers, without flavour or species added, were analysed for acrylamide content. Acrylamide content ranged from 81 to $2622 \mu\text{g kg}^{-1}$ with a mean of $740 \mu\text{g kg}^{-1}$ and a median of $592 \mu\text{g kg}^{-1}$. Similar values were reported by other authors (Rosén and Hellenäs 2002; Tareke et al. 2002; Becalski et al. 2003; Roach et al. 2003; Matthys et al. 2005) who found that acrylamide levels ranged between 224 and $3700 \mu\text{g kg}^{-1}$. Recently, a survey on acrylamide levels in potato crisps in the Turkish market showed a median level of $818 \mu\text{g kg}^{-1}$ (minimum–maximum = 59–2336) (Ölmez et al. 2008). The IRMM developed a monitoring database which was last updated in June 2006 (IRMM 2006; Wenzl and Anklaan 2007). A median level of $528 \mu\text{g kg}^{-1}$ (minimum–maximum = 5–4215 $\mu\text{g kg}^{-1}$, $n = 836$) is reported which is in line with values obtained in current survey. Results are also in concordance with the monitoring database (2002–04) from the US Food and Drug Administration (USFDA) with a mean of $612 \mu\text{g kg}^{-1}$ and a median of $462 \mu\text{g kg}^{-1}$ (<http://www.cfsan.fda.gov>). Figure 1 shows the acrylamide distribution in the survey. All samples analysed contains acrylamide levels higher than the limit of quantitation (LOQ).

However, levels of acrylamide in potato crisp marketed in Spain have been significantly reduced as

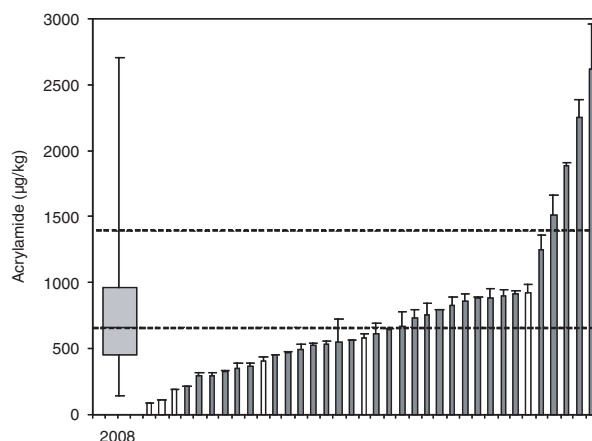


Figure 1. Box-and-Whisker plot (a) and distribution graph for the acrylamide content in Spanish potato crisps. An empty bar represents samples declared as having a low fat content ($<25\%$) by industrials. Dotted lines represent media and the observed signal value.

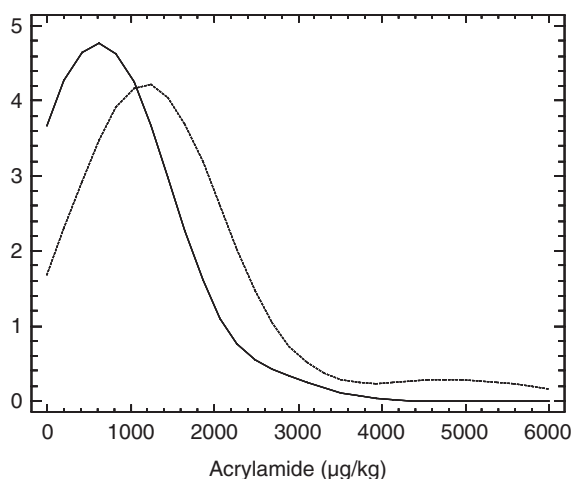


Figure 2. Smooth density plot for levels of acrylamide in the 2008 potato crisps sampling and 2004 sampling (Rufian-Henares and Morales 2006; dotted line).

compared with a previous sampling dated 2004 (Rufian-Henares and Morales 2006). In the 2004 sampling, a median and mean of 1180 and 1484 $\mu\text{g kg}^{-1}$ were obtained, whereas nearly a 50% reduction is reached in the current study. In addition, values for the first and third quartiles are diminished as well, subsequently minimizing the heterogeneity of the distribution (Figure 2).

Acrylamide reduction was analytically confirmed in the potato crisps marketed in Spain as compared with 4 years ago. Toolbox from the CIAA (Confederation of the Food and Drink Industries in the European Union) compiles a number of recommendations for effective acrylamide mitigation at industrial scale which seems to be effective among Spanish potato crisps producers (CIAA 2007). However, implementation of the Toolbox guidelines to Small and Medium enterprises is a challenge where accessibility to information is mediated by local federations of producers. Guidelines are focused on agronomical factors, storage conditions, pre-treatment and processing conditions. At this level it cannot be stated if acrylamide reduction in the Spanish potato crisps market has been due to implementation of one guideline or it is a sum of all of them. The selection of an adequate potato tuber variety with a reducing sugars content lower than 0.3% is appropriate for potato crisps (CIAA 2007). It is also noteworthy to mention that the Spanish Food Safety and Nutrition Agency (AESAN) has implemented a global strategy called NAOS to reduce the consumption of fat. According to the package label as declared by companies, six samples (approximately 17% of the total) contained levels of fat lower than 25% and claims for light potato crisps in the container. Indeed, fat content was the variable with a higher dispersion among the samples if compared with protein and

carbohydrate content. However, it was found any significant correlation between fat content and levels of acrylamide. Samples with low fat content are also depicted in Figure 1.

The WHO/JEFCA and the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) of the European Union aimed to investigate strategies to reduce acrylamide formation by implementing the ALARA principle (as low as reasonably or technically achievable). The German Federal Office of Consumer Protection and Food Safety (BVL) stated a signal value 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for potato crisps as a concept of minimization (BVL 2006). The signal value is defined as the lowest level of the 10% containing the highest level of acrylamide in a food commodity. If acrylamide contents were above this signal value, food producers should be recommended to take adequate actions to lower such contents, but at present there are no regulations or an obligation in European countries. Since 2002, the BVL published yearly the observed value for potato crisps being 1500, 1200, 1470, 1029, and 1333 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for the years 2002, 2003a, 2003b, 2004 and 2005, respectively. If the German minimization concept is applied to the Spanish potato crisps survey, most of the samples (86%) contained acrylamide levels lower than 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. However the observed value was calculated to 1377 $\mu\text{g kg}^{-1}$, being about 61% lower than value recorded in the 2004 sampling.

To monitor progress in the minimization strategies by industrials, it is useful to define limits for quality control. Three levels can be identified: acceptable (below the 50th percentile), under evaluation (50th–90th percentiles) and unacceptable (>90th percentile) (Figure 1). Samples lying in the upper region should reconsider the internal quality strategy, for instance increasing quality controls to fresh potato suppliers. Many studies demonstrated that it is possible to define time–temperature processing conditions that guarantee a low acrylamide concentration and the retention of sensorial properties in terms of colour, flavour, and starch gelatinization (i.e. Pedreschi et al. 2006). It is necessary to adjust the traditional frying conditions, supervise the process, and improve the traceability of fresh potatoes during their storage period by potato suppliers. Monitoring the database of the IRMM that tends to resemble the situation across Europe Members States recorded, at the 90th percentile, 1442 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Wenzl and Anklan 2007), which is also in line with the figure reported for the Spanish market.

Dietary intake of acrylamide from potato crisp

The Spanish authorities (Spanish National Agency of Food Safety and Nutrition, AESAN; <http://www.aesan.msc.es/>) have not yet reported mean intake values

for acrylamide for the Spanish population, and the most contributing food categories are also lacking. This investigation is a starting point to characterize the exposure to the potato crisp which is one of the most contributing food categories to acrylamide intake. In general, target food categories can be grouped in three classes according to moderate consumption but a high concentration of acrylamide (1), foods with high consumption but relatively low levels of acrylamide (2), and tailored foods to specific population groups such as elders or infants (3). Potato crisps have been identified as a major source of exposure by several studies (Svensson et al. 2003; Boon et al. 2005; Matthys et al. 2005). But the contribution of regional and local foods should be explored, like fried-dough pastries (Morales and Arribas-Lorenzo 2008). Although the levels of acrylamide in some of these products are low, they can contribute significantly to the overall intake of acrylamide. The intake of acrylamide depends consequently on the consumption pattern and acrylamide levels in foods. The contribution of individual foods to total exposure can be best identified by the deterministic approach (Petersen and Tran 2005). Two different consumption databases have been used for the estimation of the dietary acrylamide exposure from potato crisp.

First, exposure assessment was estimated from the national consumption database monitored during 2006 (MAPA 2007). Although the point estimate (deterministic approach) does not assess the probability or uncertainties or even does not identify high-risk consumers since it is based on population and not on subjects, it is a first approximation and a useful screening tool in order to design a more specific study in case of a potential risk. Indeed, many of the earlier data reported in the literature have been obtained from generalist food-intake studies for nutritional or economical monitoring purposes, but they were not specifically designed for food safety issues (Dybing et al. 2005). Furthermore, other studies link national consumption patterns with general acrylamide databases (Boon et al. 2005). In summary, to date a comprehensive study specifically designed for assessing the dietary acrylamide exposure is missing due to its complexity.

During 2006, 16% of fresh potatoes consumed in Spain were processed, and mostly bought directly by consumers (84%) as compared with consumption at restaurants, catering services or institutions (hospitals, penitentiaries, schools, etc.). It represents an overall estimation of consumption of 1.44 kg processed potato products per capita. In this estimation has not been included the frozen potato products with are mainly par-fried French fries. The average contribution of potato crisps to dietary acrylamide exposure in Spain (assuming a body weight of 70 kg) is calculated to be $0.042 \mu\text{g acrylamide kg}^{-1} \text{ body weight day}^{-1}$. One

limitation of the calculation is that a single level of consumption is used, but it has been compared with the distribution of acrylamide calculated in the commercial sampling. The risk scenario (95th percentile) is obtained with a level of $0.117 \mu\text{g acrylamide kg}^{-1} \text{ body weight day}^{-1}$, but this level does not identify subjects with high consumption patterns. Selecting high residue levels (95th percentile) in potato crisps will very likely overestimate the exposure. More realistic estimates of low and high exposure are obtained by using probabilistic models (i.e. Monte Carlo modelling) that include residues and distribution consumption patterns. As formerly explained, the deterministic method applied in this study is a useful tool for estimating the mean exposure of the population to acrylamide.

The sources of acrylamide in foods vary with national or even local dietary habits. The contribution of potato products is high, but can vary among countries. Table 1 describes the estimation of total dietary exposure to acrylamide and the contribution calculated for potato crisps as reported in different studies. For some other studies, the sum of French fries, potato crisps, and roasted potatoes is reported. Potato crisps, French fries and other products are consumed at relatively high amounts in the USA (35% of the daily intake of acrylamide) (USFDA 2004), but it is even higher in the Netherlands with French fries and crisps taken together contributing up to 50% (Konings et al. 2003; Boon et al. 2005). In general, the JECFA has estimated the variability in the contribution of potato crisps to be between 6 and 46% of the dietary acrylamide exposure, although recently Ariseto et al. (2007) reported a contribution of up to 60% of potato products in the Brazilian population. Dietary acrylamide exposure of Spanish consumers has been significantly reduced as compared with a previous study (Morales 2004, unpublished). It is nearly 3.5-fold lower than in the Netherlands (Konings et al. 2003) but in line with Sweden (Svensson et al. 2003). According to the most recent data, the average human intake is estimated to be $0.4 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ body weight day}^{-1}$ from 2 years of age onwards. However, intake may vary widely from 0.3 to $2 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ body weight day}^{-1}$ or may reach even $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ body weight day}^{-1}$ at the 99th percentile (WHO/JECFA 2005).

In consumer exposure assessments it is also important to know whether there are significant differences among different subgroups of the population. National consumption database identify five classes for indexing according to regions (17 levels for different Autonomous Communities), the size of cities (five levels), socio-economic status (four levels), family members (five levels), and cycle of life (eight levels). It was observed that there are great differences depending on the different categories studied, almost doubling the estimated exposure (Table 2). In a

Table 1. Contribution of potato crisps to dietary acrylamide exposure in different studies.

Country	Reference	Total intake ($\mu\text{g kg}^{-1}$ body weight day^{-1})	Potato crisps (%)	Partial contribution ($\mu\text{g kg}^{-1}$ body weight day^{-1})	Age (years)
USA	US Food and Drug Administration (USFDA) (2006)	0.440	11	0.045	> 2
Sweden	Svensson et al. (2003)	0.500	9	0.045	18–74
Netherlands	Konings et al. (2003)	0.480	31	0.149	1–97
Netherlands	Konings et al. (2003)	1.040	31	0.322	7–18
Netherlands	Boon et al. (2005)	0.5	15	0.075	1–97
Netherlands	Boon et al. (2005)	1.1	18	0.198	1–6
Norway	Dybing and Sanner (2003)	0.490	18	0.086	16–79 ♂
Norway	Dybing and Sanner (2003)	0.460	17	0.080	6–79 ♀
Norway	Dybing and Sanner (2003)	0.530	40	0.212	10–30 ♂
Germany	Mosbach-Schulz et al. (2003)	0.987	38*	0.371*	7–14
Germany	Mosbach-Schulz et al. (2003)	0.573	29*	0.166*	19–64
Belgium	Matthys et al. (2005)	0.513	12	0.062	13–18
Brazil	Arisseto et al. (2007)	0.550	60*	0.330*	11–17
France	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) (2005)	1.400	26*	0.357*	3–8
France	AFSSA (2005)	0.500	32*	0.161*	9–14
France	AFSSA (2005)	0.500	24	0.122	> 15
Spain	Morales (unpublished, 2004)	0.409	22	0.090	Total

*Sum of the contribution of potato crisps, French fries and roasted potatoes.

Table 2. Contribution of potato crisps to the dietary exposure to acrylamide ($\mu\text{g kg}^{-1} \cdot \text{body weight day}^{-1}$) for the total Spanish population according to different categories based on household consumption. Total national included the consumptions of household plus institutions plus restaurants.

Category	Class	Acrylamide exposure
Total national		0.042
Household national	Level	0.035
Autonomous community	Minimum	0.023
	Maximum	0.046
Population size	Minimum	0.026
	Maximum	0.041
Socio-economic status	Minimum	0.023
	Maximum	0.046
Family members	Minimum	0.026
	Maximum	0.055
Cycle of life	Minimum	0.029
	Maximum	0.064

Results are expressed as $\mu\text{g kg}^{-1} \cdot \text{body weight day}^{-1}$ on a body weight basis of 70 kg.

simplistic overview, it can be observed that the highest risk of exposure is recorded for young singles of high plus medium-to-high socio-economic status living in large cities in Catalonia. Alternately, the lowest exposure is expected for large families with children with a low socio-economic status living in villages (fewer than 2000 inhabitants) in the Canaries Islands.

The second study for exposure estimation was applied on the basis of a consumption study performed on food frequency questionnaires on three consecutive

days to different population groups (AESA 2006). In this study consumers are divided in two levels to obtain the average daily intake level of potato crisps. Regular consumers are identified as subjects with some consumption of the product and represent the 33.11% of the child population and 21.32% of the adult population. It also identified the acute consumption at the 97.5th percentile. Table 3 summarizes the results. Average dietary exposure to acrylamide for children is 2.6-fold the exposure for adults. This is

Table 3. Exposure (based on 3-day records) to acrylamide for children (body weight = 34.48 kg, $n=903$) and adult (body weight = 68.48 kg, $n=1060$) in the Spanish population.

	Mean	Minimum	Maximum	P(95)
<i>Children (7–12 years)</i>				
Average consumer	0.142	0.016	0.502	0.379
Regular consumer	0.428	0.047	1.516	1.145
Risk consumer	1.064	0.116	3.769	2.848
<i>Adults (>17–60 years)</i>				
Average consumer	0.053	0.006	0.189	0.143
Regular consumer	0.250	0.027	0.887	0.670
Risk consumer	0.602	0.066	2.131	1.610

Data are expressed as acrylamide ($\mu\text{g kg}^{-1} \cdot \text{body weight day}^{-1}$). Risk consumers are estimated at the 97.5th percentile. Mean, minimum, maximum and P(90) refer to the mean, minimum, maximum and 95th percentile of acrylamide distribution in commercial potato crisps.

expected due to a combination of lower body weight and higher caloric demand giving a higher net consumption, but also by a different dietary pattern with a higher consumption of certain foodstuffs rich in acrylamide such as French fries and potato crisps (Dybing et al. 2005; Wilson et al. 2006). It is thus clear that certain subgroups demonstrate an especially high exposure to acrylamide. This ratio is in line with that compiled by earlier studies (EFSA 2005; WHO 2005). In the worst scenario the highest intake will be 1.064 and $0.602 \mu\text{g kg}^{-1} \cdot \text{body weight day}^{-1}$ for children and adults. In 2004, our group estimated the contribution of potato crisps to total dietary intake to be 22% (Morales unpublished 2004). In the assumption that the pattern will be maintained, a risk intake (97.5th percentile) of $3.01 \mu\text{g kg}^{-1} \cdot \text{body weight day}^{-1}$ is expected which is lower than $4 \mu\text{g kg}^{-1} \cdot \text{body weight day}^{-1}$ calculated by WHO (2005).

Average levels of acrylamide exposure determined by the food consumption database (adult population = $0.053 \mu\text{g kg}^{-1} \cdot \text{body weight day}^{-1}$) and 3-day food records (total population = $0.042 \mu\text{g kg}^{-1} \cdot \text{body weight day}^{-1}$) studies are rather similar, and both values are low when compared with other countries (Table 1). Again, it is noteworthy that the expected exposure of the Spanish population to acrylamide from potato crisps is moderate. But industry should keep inspecting and control the process chain to reduce, if still technically possible, the levels of acrylamide in the final product to achieve the lowest contribution of potato crisps to global exposure to acrylamide in the Spanish population. However, patterns of consumption are rather different among the Spanish regions and some effort should be addressed by local administrations to reduce potato crisp consumption in regions with acute exposure levels, although globally the exposure is moderate as compared with other countries. It is mandatory in the near future

to design a specific consumer study for acrylamide. In the study, foods that are known to be potential sources for acrylamide should be clearly identified. On the other hand, there is a need to maintain a balance between health-promoting and nutritional components of the foods with minimization strategies to reduce acrylamide exposure, apart from sensorial properties accepted by consumers. Before any proposal of risk management or intervention by regulatory bodies, a critical evaluation of the situation is necessary.

Acknowledgements

The authors are grateful to S. Martín, S. de la Peña, D. Gomez, and M. A. Martinez-Bartolome for technical assistance. The Consejería de Educación y Ciencia (Comunidad Autónoma de Madrid) is thanked for supporting a pre-doctoral grant for G. Arribas-Lorenzo. This research was partly supported by a Scientific Research Programme of the Comunidad de Madrid (ANALISYC, S-505/AGR-0312) and a European Collective Research Project (No. CT-2005-516415) supported by the Sixth Framework Programme for Research and Technological Development.

References

- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). 2005. Report on acrylamide exposure. Available from: <http://www.afssa.fr/Documents/RCCP2002sa0300b.pdf/>.
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESa). 2006. Modelo de dieta española para la determinación de la exposición del consumidor a sustancias químicas. Madrid (Spain): Ministerio de Sanidad y Consumo, AESa.
- Alexander J. 2006. Risk assessment techniques for acrylamide. In: Skog K, Alexander J, editors. Acrylamide and other hazardous compounds in heat-treated foods. Boca Raton (FL): CRC Press. p. 275–295.
- Amrein TM, Schonbachler B, Rohner F, Lukac H, Schneider H, Keiser A, Escher F, Amadó R. 2004. Potential for acrylamide formation in potatoes: Data from the 2003 harvest. *Eur Food Res Tech.* 219: 572–578.
- Arisseto A, Toledo MC, Govaert Y, Van Loco J, Fraselle S, Caroba D. 2007. Dietary exposure of Brazilian adolescents to acrylamide. *Toxicol Lett.* 172S:S1–S240.
- Becalski A, Lau BPY, Lewis D, Seaman SW. 2003. Acrylamide in foods: occurrence, sources and modeling. *J Agricult Food Chem.* 51:802–808.
- Boon PE, De Mul A, Van der Voet H, Van Donkersgoed G, Brette M, Van Klaveren JD. 2005. Calculations of dietary exposure to acrylamide. *Mutat Res.* 580:143–155.
- BVL (German Federal Office of Consumer Protection and Food Safety). 2006. [cited 2007]. Available from: http://www.bvl.bund.de/cln_027/nn_521172/EN/01_Food/04_Acrylamid_en/05_Signalwerte_en/signalwerte_node.html_nnn=true/.

- CIAA (Confederation of the Food and Drink Industries in the European Union). 2007. The CIAA acrylamide 'toolbox'. Rev. 11, December 2007. Available from: <http://www.ciaa.be/documents/brochures/toolbox%20rev11%20nov%202007final.pdf/>.
- De Wilde T, De Meulenaer B, Mestdagh F, Govaert Y, Vandeburie S, Ooghe W, Fraselle S, Demeulemeester K, Van Peteghem C, Calus A, et al. 2005. Influence of storage practices on acrylamide formation during potato frying. *J Agricult Food Chem.* 53:6550–6557.
- Dybing E, Farmer PB, Andersen M, Fennell TR, Lalljie SPD, Muller DJG, Olin S, Peterson BJ, Schlatter J, Scholz G, et al. 2005. Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem Toxicol.* 43:365–410.
- Dybing E, Sanner T. 2003. Risk assessment of acrylamide in foods. *Toxicol Sci.* 72:144.
- Erdogdu SB, Palazoglu TK, Gökmen V, Şenyuva HZ, Ekiz HI. 2007. Reduction of acrylamide formation in French fries by microwave pre-cooking of potato strips. *J Sci Food Agricult.* 87:133–137.
- European Commission. 2000. Risk assessment of acrylamide (CAS No. 79-06-1, EINECS No. 201-173-7). Draft Risk Assessment Report Prepared by the UK on behalf of the European Union in the Framework of Council Regulation (EEC) 793/93 on the evaluation and control of the risks of 'existing' substances. European Commission, Joint Research Centre, European Chemicals Bureau, Ispra, October 2000. Available from: <http://ecb.jrc.it/existing-chemicals/>.
- European Commission. 2007. European Commission Directive 2007/33/CE. Commission Recommendation of the 3 of May 2007 on the monitoring of acrylamide levels in food. DOCE 12.5.2007 L/123/33-40.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2005. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic (Request No. EFSA-Q-2004-020). Adopted on 18 October 2005.
- Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 2005. Acrylamide in food is a potential health hazard. Infosan Information Note n.2/2005-tv Acrylamide. International Food Safety Authorities Network. Available from: www.who.int/foodsafety.
- Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 2005. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Summary and conclusions report from the 64th Meeting, Rome, Italy, 8–17 February 2005. Available from: ftp://ftp.fao.org/esn/jecfa/jecfa64_summary.pdf/.
- Franke K, Sel M, Reimerdes EH. 2005. Quality related minimization of acrylamide formation – an integrated approach. In: Friedman M, Mottram D, editors. *Chemistry and safety of acrylamide in food*. New York (NY): Springer. p. 357–369.
- Friedman M. 2003. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J Agricult Food Chem.* 51: 4504–4526.
- Gertz C, Klostermann S. 2002. Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *Eur J Lipid Sci Tech.* 104:762–771.
- Gökmen V, Şenyuva HZ. 2007. Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chem.* 103:196–203.
- Granda C, Moreira RG, Tichy SE. 2004. Reduction of acrylamide formation in potato chips by low-temperature vacuum frying. *J Food Sci.* 69:E405–E411.
- Heat-generated food toxicants: identification, characterisation and risk minimisation. HEATOX project (CT-2003-506820), April 2007, Skog K, Lund University, Sweden.
- Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM). 2006. Acrylamide Monitoring Database. Available from: <http://www.irmm.jrc.be/html/activities/acrylamide/database.htm/>.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 1994. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Industrial Chemicals No. 60. Lyon (France): IARC.
- Kita A, Brathen E, Knutsen SH, Wicklund T. 2004. Effective ways of decreasing acrylamide content in potato crisps during processing. *J Agricult Food Chem.* 52:7011–7016.
- Konings EJ, Baars AJ, Van Klaveren JD, Spanjer MC, Rensen PM, Hiemstra M, Van Kooij JA, Peters PW. 2003. Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks. *Food Chem Toxicol.* 41:1569–1579.
- Matthäus B, Haase NU, Vosmann K. 2004. Factors affecting the concentration of acrylamide during deep-fat frying of potatoes. *Eur J Lipid Sci Tech.* 106:793–801.
- Matthys C, Bilau M, Govaert Y, Moons E, De Henauw S, Willems JL. 2005. Risk assessment of dietary acrylamide intake in Flemish adolescents. *Food Chem Toxicol.* 43: 271–278.
- Mestdagh F, Maertens J, Cucu T, Delporte K, Van Peteghem C, De Meulenaer B. 2008. Impact of additives to lower the formation of acrylamide in a potato model system through pH reduction and other mechanisms. *Food Chem.* 107:26–31.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). 2007. La alimentación en España. Madrid (Spain): MAPA.
- Morales FJ, Arribas-Lorenzo G. 2008. The formation of potentially harmful compounds in churros, a Spanish fried-dough pastry, as influenced by deep drying conditions. *Food Chem.* 109:421–425.
- Morales FJ, Capuano E, Fogliano V. 2008. Mitigation strategies to reduce acrylamide formation in fried potato products. *Ann NY Acad Sci.* 1126:89–100.
- Mosbach-Schulz O, Seiffert I, Sommerfeld C. 2003. Abschätzung der Acrylamid-Aufnahme durch hochbelastete Nahrungsmittel in Deutschland [Internet]. Available from: http://www.bfr.bund.de/cms/media.php/70/abschaetzung_der_acrylamid_aufnahme_durch_hochbelastete_nahrungsmittel_in_deutschland_studie.pdf/.
- Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, vol. 580, issues 1–2, 7 February 2005, pp 3–176.
- Noti A, Biedermann-Brem S, Biedermann M, Grob K, Albisser P, Realini P. 2003. Storage of potatoes at low temperature should be avoided to prevent increased

- acrylamide during frying or roasting. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*. 94:167–180.
- Ölmez H, Tuncay F, Özcan N, Demirel S. 2008. A survey of acrylamide levels in foods from the Turkish market. *J. Food Composition Anal.* 21:564–568.
- Parzelfall W. 2008. Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. *Food Chem Toxicol.* 46:1360–1364.
- Pedreschi F, Kaack K, Granby K. 2004. Reduction of acrylamide formation in potato slices during frying. *LWT – Food Sci Tech.* 37:679–685.
- Pedreschi F, Kaack K, Granby K. 2006. Acrylamide content and colour development in fried potato strips. *Food Res Int.* 39:40–46.
- Pedreschi F, Leon J, Mery D, Moyano P, Kaack K, Granby K. 2007. Colour development and acrylamide content of pre-dried potato chips. *J Food Eng.* 79:786–793.
- Petersen BJ, Tran N. 2005. Exposure to acrylamide. Placing exposure in context. In: Friedman M, Mottram D, editors. *Chemistry and safety of acrylamide in food*. New York (NY): Springer Science. p. 63–76.
- Roach JAG, Andrzejewski D, Gay ML, Nortrup D, Musser SM. 2003. Rugged LCMS/MS survey analysis of acrylamide in foods. *J Agricult Food Chem.* 51:7457–7554.
- Rosén J, Hellenäs KE. 2002. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst.* 127:880–882.
- Rufian-Henares JA, Arribas-Lorenzo G, Morales FJ. 2007. Acrylamide content in selected Spanish foods: Survey of biscuits and bread derivatives. *Food Addit Contam.* 24: 343–350.
- Rufian-Henares JA, Morales FJ. 2006. Determination of acrylamide in potato chips by a reversed-phase LC-MS method based on a stable isotope dilution assay. *Food Chem.* 97:555–562.
- Şenyuva HZ, Gökmen V. 2006. Interference-free determination of acrylamide in potato and cereal-based foods by a laboratory validated liquid chromatography-mass spectrometry method. *Food Chem.* 97:539–545.
- Shipp A, Lawrence G, Gentry R, McDonald T, Bartow H, Bounds J, Macdonald N, Clewell H, Allen B, Van Landingham C. 2006. Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Crit Rev Toxicol.* 36:481–608.
- Svensson K, Abramsson L, Becker W, Glynn A, Hellenäs KE, Lind Y, Rosén J. 2003. Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food Chem Toxicol.* 41:1581–1586.
- Taeymans D, Wood J, Ashby P, Blank I, Studer A, Stadler RH, Gonde P, Van Eijck P, Lalljie S, Lingnert H. 2004. A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 44:323–347.
- Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agricult Food Chem.* 50:4998–5006.
- US Food and Drug Administration (USFDA). 2004. Exploratory data on acrylamide in food 2003. Total diet study results. Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acrydat2.html#table4/>.
- US Food and Drug Administration (USFDA). 2006. The 2006 exposure assessment for acrylamide. DeNovi M, May 2006. Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acryexpo.html/>.
- Wenzl T, Ankla E. 2007. European Union database of acrylamide levels in food. Update and critical review of the collection. *Food Addit Contam.* 24:5–12.
- Wenzl T, De la Calle MB, Ankla E. 2003. Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review. *Food Addit Contam.* 20:885–902.
- Wilson KM, Rimm EB, Thompson KM, Mucci LA. 2006. Dietary acrylamide and cancer risk in humans: a review. *J Verbraucherschutz Lebensmittelsicherheit.* 1:19–27.
- World Health Organization/Joint Expert Committee on Food Additives (WHO/JECFA). 2005. 64th Meeting, Roma, Italy, 7–17 February 2005. Available from: http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en/summary_report_64_final.pdf/.
- Zhang Y, Zhang GY, Zhang Y. 2005. Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods – review and recent developments. *J Chromatograph A.* 1075:1–21.

4.2. Estimación de la ingesta en la población española de hidroximetilfurfural, y sustancias relacionadas, a partir del café

El café ha sido propuesto como la fuente más importante de ingesta de HMF para la población en países desarrollados, tanto por los altos niveles encontrados como por su elevado consumo. El objetivo de este trabajo es, por tanto, realizar un estudio sobre los cafés tostados molidos (natural, torrefacto y mezcla) y los café solubles, comercializados en España, y evaluar su contribución a la ingesta diaria de HMF en la población española.

El método utilizado para analizar el contenido de HMF y furfural implicó tres etapas consecutivas de extracción con el fin de asegurar la máxima recuperación. La cuantificación se realizó mediante LC de fase inversa con detección ultravioleta. Los LOQ para el HMF y furfural fueron de 4 y 20 mg/kg, respectivamente. Por otro lado, el HMFA y el FA fueron cuantificados de forma independiente por LC de par iónico con detector ultravioleta. Los LOQ calculados fueron de 20 y 50 mg/kg para el HMFA y FA, respectivamente.

Se analizaron un total de 35 muestras de café molido y 19 de café soluble. Los valores de HMF encontrados en los diferentes tipos de café tostado fueron: 110, 625, 1734 y 2480 mg/kg para el café natural, molido, torrefacto y soluble, respectivamente. Sin embargo, los valores de HMFA y FA no mostraron diferencias significativas, encontrándose niveles alrededor de 600 mg/kg.

La evaluación de la exposición del HMF a partir del café se estimó teniendo en cuenta la base de datos nacional de consumo del MAPA (2009) a través de un modelo determinístico. La ingesta diaria total de HMF fue estimada en 9,59 mg/día, y si se tiene en cuenta el consumo específico de cada tipo de tostado de café, el valor fue de 5,26 mg/día.

Aunque en la actualidad no hay reglamento o recomendaciones que fijen los límites máximos de HMF en los alimentos, excepto para el caso de la miel por problemas de adulteración, este estudio serviría como base en futuros debates de expertos y gestores de riesgos tanto en España como en Europa.

Este artículo ha sido publicado en la revista *Food and Chemical Toxicology* bajo el título ***“Estimation of dietary intake of 5-hydroxymethylfurfural and related substances from coffee to Spanish population”***.



Estimation of dietary intake of 5-hydroxymethylfurfural and related substances from coffee to Spanish population

Gema Arribas-Lorenzo, Francisco J. Morales *

Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto del Frío, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 August 2009

Accepted 23 November 2009

Keywords:

Hydroxymethylfurfural

Hydroxymethylfuroic acid

Dietary intake

Coffee

Food contaminants

Maillard reaction

ABSTRACT

5-Hydroxymethylfurfural (HMF) is naturally formed during food processing or cooking activities, giving its ubiquity in the Western diet. HMF could be metabolised to 5-sulfoxymethylfurfural making HMF potentially harmful in an extent unknown at present. Coffee is the main exposure source. Occurrence of HMF, 5-hydroxymethyl-2-furoic acid (HMFA) and 2-furoic acid (FA) were measured in commercial ground coffee and soluble coffee marketed in Spain. Levels of 110, 625, 1734, 2480 mg HMF/kg were obtained for natural, blend, torrefacto and soluble coffee, respectively, giving four classes significantly different. Soluble coffee showed the largest variability in HMF. Levels of HMFA and FA did not change significantly being about 600 mg/kg. Dietary exposure to HMF coffee to consumption in the total Spanish population was estimated to be 8.57 mg/day by using a deterministic approach. However, median level was recalculated to 5.26 mg HMF/day when specific contribution of each type of ground and soluble coffee in the consumption habits was considered. Resultant value is above of the threshold of concern (1600 µg HMF/day, mTAMDI). A level of 8.57 mg HMF/day in persons with high consumption habits (95th percentile) was calculated for risk assessment.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

During heat processing of foods, a complex set of chemical and biochemical reactions are taking place which will definitively affect the final properties of food, including organoleptical, textural, nutritional and health-related properties (O'Brien and Morrissey, 1989). It is known that potential toxic compounds are formed during the extent of the browning reactions in foods such as heterocyclic amines or acrylamide. But toxicology and genotoxicity of other substances like furfurals and related substances which are formed in large quantities from both sugar dehydration and Maillard reaction are still under evaluation (EFSA, 2005; NTP, 2008).

Hydroxymethylfurfural (HMF) has been shown to be bioactivated in vitro to 5-sulfoxymethylfurfural (SMF), through sulfonation of its allylic hydroxyl functional group, catalysed by sulfotransferases (SULTs). In the resulting ester, the sulphate is a good leaving group, thus producing a highly electrophilic allyl carbocation, which could be stabilized by distribution of charges on the furan ring (Surh and Tannenbaum, 1994). SMF has been demonstrated to induce genotoxic and mutagenic effects to bacterial and mammalian cells (Glatt and Sommer, 2006). The subsequent interaction

of this reactive intermediate with critical cellular nucleophiles (i.e., DNA, RNA, and proteins) may result in structural damages to these macromolecules, thereby causing toxicity and mutagenicity, although its occurrence in vivo has not been confirmed yet (Glatt and Sommer, 2006; Janzowski et al., 2000). HMF has been identified as initiator and promoter of colon cancer in rats (Zhang et al., 1993) and nephrotoxicity (Bakhiya et al., 2009). But extrapolation to humans could be more dramatic since humans express SULT in extrahepatic tissues more extensively than rats and may therefore be more sensitive to HMF (Teubner et al., 2007).

In foods, HMF and related substances formed from dehydration reactions of reducing sugars are summarised in Fig. 1. In addition, HMF and furfural (FURF) can react further by decarboxylation (a), oxidation (b), dehydration (c), and reduction (d) reactions to form different intermediates, apart from polycondensation reactions to form final Maillard reaction products such as melanoidins (Antal et al., 1990; Feather and Harris, 1973; Theander, 1981; Kroh, 1994). Extensive dehydration of HMF will give levulinic acid and formic acid. HMFA and furan-2,5-dicarboxylic acid (FDCA) are formed from oxidation of HMF where furoic acid FA and hydroxymethylfuroic acid (HFA) are formed from oxidation of furfural (FURF).

HMF is widespread distributed in the western diets since it is largely formed in many processed foods and domestic cooking, see Morales (2009) for a review. In a recent study on dietary exposure to HMF from Norwegian population by a 24 h dietary recall, coffee was identified as the most important source of HMF (63%),

* Corresponding author. Address: Instituto del Frío, CSIC, José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 549 2300; fax: +34 91 549 36 27.

E-mail address: fjmorales@if.csic.es (F.J. Morales).

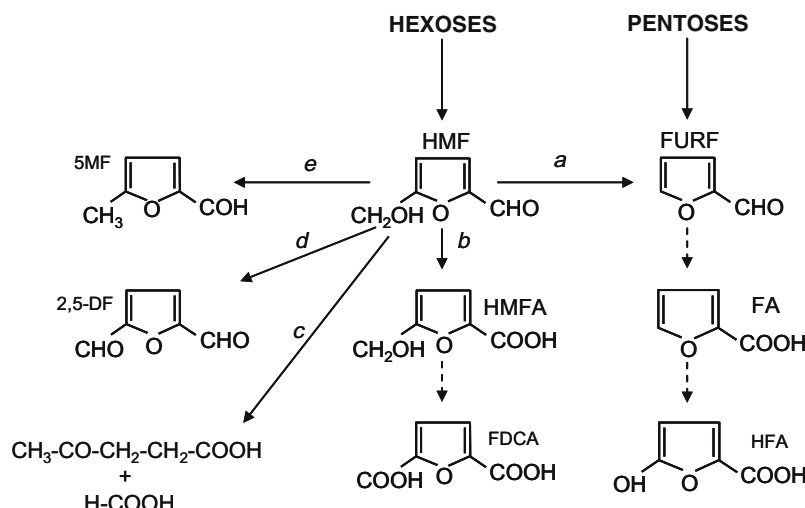


Fig. 1. Routes of formation and degradation of hydroxymethylfurfural (HMF) and related substances by decarboxylation (a), oxidation (b), dehydration (c) and reduction (d). Hydroxymethylfuroic acid (HMFA), 2-furoic acid (FA), furfural (FURF), 2,5-dicarboxylic acid (2,5DF), 5-methylfurfural (5MF), hydroxyfuroic acid (HFA).

both because of the high levels of HMF in coffee and because the high consumption (Husøy et al., 2008). It was estimated the HMF intake at 5.56 mg/day. Then, given the popularity of coffee in western diet it is relevant to obtain a picture of the current situation in other EU countries with different habits of consumption such as Spain. In this sense, Rufián-Henares and de la Cueva (2008) published an assessment of HMF intake in the Spanish diet with a mean of 10 mg/day from total consumption databases and the contribution of coffee was 50.43% to the total dietary exposure. However, this study could be biased since HMF data from some food items were extrapolated from studies in other countries and did not match the situation in Spain. Previously, in a study on a cohort of Spanish adolescent it was estimated a mean HMF intake of 5.08 mg/day where cereals and related food commodities were the main contributors (Delgado-Andrade et al., 2007).

Besides the toxicological relevance of HMF and related substances, it is mandatory to evidence and to compare the intake with other EU state members before to further decision on risk management. In addition, it is necessary to supply the tools to assess the monitoring progresses which are necessary in minimisation strategies applied at industrial level. Since, coffee account significantly to the daily intake of HMF (Husøy et al., 2008) it is necessary to get more insight on the occurrence and sources of variability. This paper is aimed to contribute to a better understanding of sources and levels of HMF intake from coffee consumption in the Spanish population taking into account the partial contribution of ground and soluble coffee.

This investigation presents a survey on commercial roasted ground coffee (natural, torrefacto, and blend) and soluble coffee marketed in Spain and its contribution to daily intake of HMF based on a deterministic exposure model. At the same time this investigation will provide scientific data basis to afford a precise study in a future by Spanish Administration bodies.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

All chemical used were of an analytical grade and were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless mentioned otherwise. 5-Hydroxymethyl-2-furoic acid (HMFA, CAS# 6338-41-6) was purchased from Matrix Scientific (Columbia, USA), HMF (5-hydroxymethylfurfural, CAS# 67-47-0), FURF (furfural, CAS# 98-01-1) and FA (2-furoic acid, CAS# 88-14-2) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tetramethyl-ammonium hydrogen sulphate (THAMS) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland).

2.2. Samples

Experiments were conducted with a series of commercial roasted coffee (35 brands from 21 producers) and soluble coffee (19 brands from 11 producers) randomly purchased on different supermarkets in June 2008. Samples were distributed according to their label, being natural, torrefacto and blend (natural with variable proportions of torrefacto roasted coffee). Samples (300 g) were grinded, if necessary, and a portion (100 g) was distributed in two containers and stored under vacuum and light protected at 4 °C until analysis.

2.3. RP-HPLC–UV determination of HMF and furfural

HMF and furfural determinations in coffee were determined by reversed-phase chromatography. Ground sample (500 mg) was suspended in 5 mL of 0.1% formic acid solution in a 10 mL centrifuge tube. The tube was shaken vigorously for 1 min and clarified with 250 µL each of potassium ferrocyanide (15% w/v) and zinc acetate (30% w/v) solutions. The resulting mixture was centrifuged at 4500g for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected in a 10 mL volumetric flask and two further extractions were performed using 2 mL of 0.1% formic acid solution. The supernatants were pooled, filtered (0.45 µm) and diluted 10-fold for HPLC analysis. The quantification of HMF and FURF was conducted with a Shimadzu HPLC system (Kyoto, Japan) equipped with a LC-20AD pump, a SIL-10ADvp autosampler, a CTO-10ASVP oven, and a DAD (SPD-M20A). The chromatographic separations were performed on a Mediterranean-Sea ODS2 column (250 × 4.0 mm, 5 µm, Teknokroma, Barcelona, Spain) thermostatised at 32 °C at a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase was a mixture of acetonitrile in 0.1% formic acid (5% v/v). The UV detector was set at 280 nm and 10 µL of the extract was injected. HMF and FURF were quantified using the external standard method within the range 0.1–10 mg/L, and 1–10 mg/L for HMF and FURF respectively. Sample reporting levels of HMF or FURF outside the calibration range were additionally diluted 10-fold in mobile phase. LOQ for HMF and FURF were 4 mg/kg and 20 mg/kg respectively. Recovery of HMF and FURF in spiked (150 µg/kg) coffee samples was 98.6% and 92.1% for HMF and FURF, respectively.

2.4. IP-HPLC–UV determination of HMFA and FA

Procedure was adapted from Murkovic and Bornik (2007). Ground sample (500 mg) was suspended in 5 mL of 0.1% formic acid solution in a 10 mL centrifuge tube and was shaken vigorously for 1 min. Solution was clarified with 250 µL each of potassium ferrocyanide (15% w/v) and zinc acetate (30% w/v) solutions, and centrifuged at 4500g for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected in a 10 mL volumetric flask and two further extractions were performed using 2 mL of 0.1% formic acid solution. After that, supernatants were pooled. Supernatant (0.5 mL) was loaded onto a pre-conditioned SPE cartridge (SEP-PAK plus C18, Waters, Milford, MA, USA) and eluent was discharged. Ten milliliter of a 10% methanol solution containing 5 mM of TMAHS was loaded and eluent was collected after discard the first eight drops. The analyses of HMFA and FA were carried out on a liquid chromatograph Shimadzu HPLC system (Kyoto, Japan) previously described. The separation was carried out on a Mediterranean-Sea ODS2 column (250 × 4.0 mm, 5 µm, Teknokroma, Barcelona, Spain). HMF and HMFA were eluted with a mixture of water (90%) and methanol (10%) containing 5 mM TMAHS as ion-pairing reagent for the carboxylic acid. The flow was 1 mL/min and the injection volume 20 µL. HMFA

and FA were detected at 255 nm and additionally characterised by UV-scan. HMF and FA eluted at 9.2 and 12.5 min respectively. For HMFA and FA, the LOQ were evaluated as 20 and 50 mg/kg, respectively. Recovery of HMFA and FA in spiked (150 mg/kg) coffee samples was higher than 97.2%.

2.5. Food consumption data

In order to calculate the dietary intake of HMF from roasted coffee a food consumption database was used. Exposure study was carried out from the Spanish National Agricultural, Fishing and Food Administration based on a yearly consumption database. It is a food survey annually published (MAPA, 2009). This is the most recent measurement of dietary consumption in Spain at a national level. In this survey data are collected from 8240 interviews to noninstitutionalized households and 898 interviews to restaurants, catering services, Institution (hospital, public schools, penitentiary, etc.), covering 2008. The statistical universe of the study compile a balanced, representative and stratified probability sample of the Spanish population taking into account, gender, ages, regions, socio-economic status, among others. An average body weight of 70 kg was used to estimate the total daily intake of HMF to total population and expressed as µg/kg bw/day. Specific data of distribution of coffee consumption according to the type of process were supplied by the Coffee Spanish Federation (FEC, 2009).

2.6. Statistical analysis

Analyses were performed using Statgraphics Plus, version 5.1, 2001 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA). At least, two independent analyses were carried out per sample.

3. Results and discussion

3.1. Analysis of HMF, FURF, HMFA, and FA in roasted coffee

Literature compiles different chromatographic procedures for determination of furfurals in coffee and coffee substitutes which are mostly carried out by reverse-phase HPLC (Morales, 2009). Traditionally, HMF and FURF have been recorded at 280 nm since it is a compromise between maximum wavelength, 284 and 277 for HMF and FURF, respectively. The method described by Rufian-Henares et al. (2006) was applied which involve three consecutive extraction steps in order to obtain the highest recovery. This sequential extraction approach is absolutely necessary to coffee samples since often less than 87% of initial HMF and FURF is solubilised in the first extraction step (data not shown).

Fig. 2a describes a classical chromatographic profile of HMF and FURF in a ground coffee sample (natural) being both compounds identified by comparison retention time and corresponding spectral profile with standards. HMF and FURF show a maximum peak at 284 and 277 nm, respectively and a secondary peak at 231 and 228 nm, respectively. HMFA and FA were quantified separately by ion-pairing HPLC as described by Murkovic and Bornik (2007). Fig. 2b depicted a chromatogram of a ground coffee sample (natural) and HMF, HMFA, FURF, and FA can be simultaneously recorded. However, procedure was just used for HMFA and FA since response to HMF and FURF was lower. HMFA showed a maximum at 258 nm and FA at 252 nm without secondary peaks. In coffee samples, HMFA and FA eluted as pure peaks, according to their uv-spectrum. This fact is important for FA since contamination with maltol (3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one) is possible but scan of maltol has two characteristics peaks, 274 nm and 214 nm at the elution conditions applied and can be easily discriminated.

3.2. Occurrence of HMF, FURF, HMFA and FA in roasted coffee

A total of 35 samples of ground coffee marketed in Spain were studied: 15 from natural, 11 from blend and 13 from torrefacto. In addition, 19 samples of soluble coffee were analysed but only 8 were identified according to the type of processing, being 7 natural and 1 torrefacto. According to the granulometry of the powder, soluble coffee samples were subdivided in traditional spray drying and modern lyophilization.

Table 1 describes the levels of HMF, HMFA, and FA in the survey of Spanish marketed ground coffees. In addition, levels of furanic substances were divided according to the type of the label in the product as torrefacto, natural and blend. FURF was not included since levels were below LOQ for most of the samples analysed, although the highest value recorded was 180 mg/kg. As expected, HMF shows a wide variation in ground coffee samples from 24 mg/kg to 2186 mg/kg, nearly 100 times, being 689 mg/kg the mean. The differences observed were attributed to the type of processing (discussed later) and conditions applied. However, HMFA and FA showed a limited variation with differences between minimum and maximum of 3.5 and 2-fold, respectively. HMFA and FA levels are in the same order of magnitude than average values recorded for HMF. Average levels of HMF, HMFA and FA were 689, 600 and 580 mg/kg, respectively. Levels of HMFA and FA were nearly 3–4 times lower in soluble coffee than in ground coffee likely due to loss during evaporation and drying steps. However, sampling in soluble coffee highlighted a significantly higher occurrence of HMF as compared with ground coffee as described in Table 1. Levels of HMF in soluble coffee ranged from 691 to 4023 mg/kg with a mean of 2480 mg/kg. It is noteworthy to mention that the minimum level of HMF content in soluble coffee was similar to the mean level reported for the whole group of ground coffee. A more detailed study on the HMF distribution in coffee highlighted that two maximums of frequency at 2100 and 3200 mg/kg were detected for soluble coffee and a main peak at 600 mg/kg and a secondary peak at 2000 mg/kg were observed for ground coffee. The differences in the distribution of HMF were correlated to the type of processing for ground coffee, but there was not a clear criteria (source of ground coffee, distillation, and type of evaporative process) to justify the two well-defined maximums in soluble coffee.

HMF is a classical marker of the extent of both the Maillard reaction and caramelisation, and consequently an index of the thermal treatment (heat load) applied. In the case of coffee, roasting of green beans is a complex technological process where water loss and final colour of the roasted beans reflect the end of the process. From a commercial point of view, arabica coffee (*Coffea arabica*) is the most highly produced variety in the world, as compared with Robusta coffee (*Coffea canephora* var. *Robusta*). Blends of Arabica and Robusta coffees at different proportions from 80:20 to 90:10 are commonly chosen by consumers. Torrefacto is a roasting process classical from Spain which sugar is added to green coffee (usually Robusta variety) up to 15 kg sucrose/100 kg green coffee with the aim to intensify the extent of the Maillard reaction. Then, in the Spanish market there are available three types of coffees that are labelled as natural, torrefacto, and blends with different proportions of natural and torrefacto (usually up to 30–40%). Literature described that HMF content is remarkably high; up to 6000 mg/kg in roasted products (Kanjahn et al., 1996). Murkovic and Pichler (2006) reported levels between 262 and 547 mg/kg. Values obtained in this study are in line with literature.

Furthermore, a specific study was carried in the three types of ground coffee which are consumed in Spain, natural coffee (obtained from traditional roasting of coffee beans), *torrefacto* (addition of sucrose before roasting) and blend (mixture of natural and *torrefacto* ground coffee at different proportions). Literature described amounts between 26 and 120 mg/kg in natural coffees and between 500 and 2300 mg/kg in *torrefacto* coffee (Kanjahn et al., 1996). Further statistical analysis by applying ANOVA one-way clearly showed significant differences ($P < 0.01$) among natural, blend and *torrefacto* coffees where the highest value was for *torrefacto* coffee. It is noteworthy to mention that soluble coffee showed the highest level of HMF but levels of HMFA and FA were reduced likely due to the instability during the evaporation step.

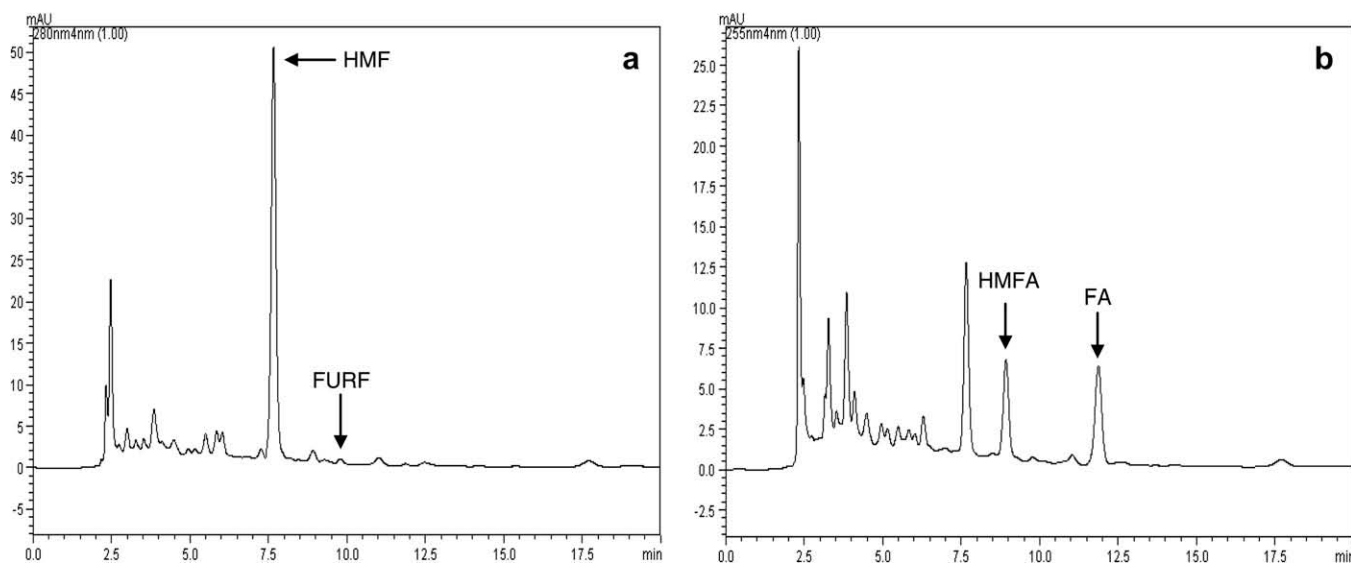


Fig. 2. Chromatogram of HMF and FURF separation (a) and HMFA and FA (b) in ground coffee.

However, HMFA and FA values have not shown statistically significant differences among type of coffee processing; even it was found any significant correlation ($P < 0.05$) between HMFA or FA and HMF, neither between HMFA and FA. It is expected that other chemical reactions different to the formation route of HMF are taking place in the formation of HMFA and FA. It has been reported in the literature that HMF decreased with higher degree of roasting whereas HMFA did not change (Murkovic and Bornik, 2007). It has been stated that HMFA is also formed from different precursors than HMF namely glyceraldehyde and pyruvate.

The type of coffee brew preparation is also important to be considered since the modality of consumption is tightly associated with social habits and culture of different countries. Briefly, filter coffee brew, plunger coffee brew, mocha coffee brew and espresso coffee brew are common procedures where different ground coffee: water ratio is used (López-Galilea et al., 2007; Sánchez-González et al., 2005). Brewing procedure is different since filter coffee is an infusion method, Italian coffeemakers work at 0.5–1 bar, and espresso machine works at a pressure of 15 bar. Table 2 described the estimation of HMF content per cup of coffee (serving size) according to the brewing procedure. Higher levels of HMF are expected in filter coffee (4.01 mg HMF per cup) due to the higher final volume.

3.3. Dietary intake of HMF from coffee

Several studies point out to coffee as the main contributor to the daily intake of HMF (i.e. Husøy et al., 2008) and specifically in the Spanish diet (Rufián-Henares and de la Cueva, 2008). This is due not only for the high level of HMF content but also to the high consumption rate as compared with other food commodities. In this sense, it is necessary to characterise the partial contribution of each type of coffee and subsequently the impact of the type of preparation of the coffee brew on the daily intake. However, the estimation of Rufián-Henares and de la Cueva (2008) for coffee was not rough enough for this purpose since raw data from ground coffee was not obtained directly from the Spanish market and it was based on estimation from the Austrian market (Murkovic and Pichler, 2006). Spanish coffee market is particular and different to Northern countries since consumption of torrefacto coffee is present as opposite to other European countries. In a short-term exposure study on a Norwegian cohort, Husøy et al. (2008) also identifies coffee consumption as the most important source for

dietary intake of HMF, increasing the contribution up to 63%, both because of the high levels of HMF in coffee and because of the high consumption of coffee in the Norwegian population.

Exposure assessment from coffee was estimated from the national consumption database monitored during 2008 (MAPA, 2009). Although the point estimate (deterministic approach) does not assess the probability or uncertainties or even does not identify high-risk consumers since it is based on population and not on subjects, it is a first approximation and a useful screening tool in order to design a more specific study in case of a potential risk. Total consumption of coffee in Spain was 3.129 kg/year/capita where consumption at home, and outside were 55.12%, and 44.88%, respectively. There was not a preference of coffee consumption between outside and at-home, but compared to 2007 the total coffee consumption was slightly increased.

Table 3 summarised the estimation of HMF dietary intake by the point estimate approach in four different scenarios. If the median value experimental HMF concentration for coffee is considered, it leads to a daily intake of 9.59 mg HMF per person, but in the worst scenario, intake is increased until 34.49 mg HMF per person. It was only considered the scenario for adult consumption since coffee and derivatives are not recommended for children and adolescent. Rufián-Henares and de la Cueva (2008) estimated a total dietary intake of 9.7 mg HMF/day for the Spanish population for 2006 and the partial contribution of coffee was 50.43%, which represents 4.9 mg HMF/day the contribution of coffee. In the study of Rufián-Henares and de la Cueva (2008) the reference mean value for coffee was obtained from Murkovic and Pichler (2006) over 22 samples of ground coffee ranging from 300 to 1900 mg/kg of HMF. Then, contribution of soluble coffee and torrefacto coffee was not considered. As described previously, levels of HMF in torrefacto and soluble coffee were significantly higher as compared to natural and blend ground coffee. But the consumption of coffee in Spain is low if compared to other countries in Europe, USA, Canada but higher than Japan, according to latest worldwide consumption data for 2007 (FEC, 2009).

It is possible to correct the estimation HMF intake by the point estimate approach to a more realistic scenario based on the previous study carried out on the different types of coffees. Table 4 described the contribution of each type of coffee to the final estimation of HMF dietary intake. Possible bias caused by taking all types of coffees at once was corrected and a value of 5.26 mg HMF/day was obtained which is nearly half of the rough

Table 1

Distribution of hydroxymethylfurfural (HMF, mg/kg), hydroxymethylfuroic acid (HMFA, mg/kg), and furoic acid (FA, mg/kg) in ground coffee and soluble coffee. Ground coffee is subdivided in natural, blend and Torrefacto.

	Mean	Median	Min	Max	P(5)	P(25)	P(75)	P(95)
<i>Ground coffee-all</i>								
HMF	689	368	24	2186	55	134	1119	1866
HMFA	600	577	281	1002	364	485	728	835
FA	580	559	400	813	419	503	657	794
<i>Ground coffee-natural</i>								
HMF	110	128	24	182	33	67	140	172
HMFA	655	693	281	1002	424	258	759	861
FA	603	602	429	812	452	546	675	733
<i>Ground coffee-blend</i>								
HMF	625	641	303	1071	313	397	741	1027
HMFA	602	581	327	787	405	525	728	773
FA	622	598	454	813	474	551	682	800
<i>Ground coffee-torrefacto</i>								
HMF	1734	1739	1168	2186	1343	1688	1855	2068
HMFA	503	465	379	915	383	398	510	780
FA	489	454	400	638	405	421	542	601
<i>Soluble coffee-all</i>								
HMF	2480	2433	691	4023	1303	1730	3237	3912
HMFA	220	241	61	315	107	165	279	302
FA	184	188	105	233	123	167	205	231
<i>Total coffee</i>								
HMF	1320	1119	24	4023	64	171	1882	3824

Table 2

Estimation of occurrence of HMF in a coffee cup according to the brewing procedure.

	Ratio coffee/water, g/mL	Serving size, mL/cup	Coffee serving size, g/cup	HMF median content, mg/cup	HMF minimum content, mg/cup	HMF maximum content, mg/cup
Espresso	0.031	45	1.41	0.519	0.012	0.027
Filter	0.082	133	10.90	4.011	0.096	0.210
Italian	0.089	55	4.88	1.794	0.043	0.094
Soluble	0.020	55	1.10	2.676	1.849	7.440

Table 3

Estimation of HMF dietary intake by the consumption of coffee (ground + soluble) by point estimate approach at four different scenarios.

	Consumption		Intake	
	Coffee, g/capita/day	HMF content, mg/kg	HMF, mg/day	70 kg (adult), µgHMF/bw/day
Median	8.57	1119.30	9.59	137.07
Minimum	8.57	23.58	0.20	2.89
Maximum	8.57	4023.26	34.49	492.68
P(95)	8.57	3824.07	32.78	468.29

former calculation. But level of exposure could reach up to 8.57 mg/day for population with high consumption habits (Table 5).

Morales (2009) reviewed the exposure, toxicology, biotransformation, and risk assessment of HMF in foods. The Scientific panel of Food Additives, Flavourings, processing aids and material in contact with foods (AFC) identified the limited number of toxicological studies to conform a complete risk assessment evaluation of non-sulphur substitutes furan derivatives. However, it was established an mTAMDI value (modified Theoretical added maximum daily in-

Table 4

Estimation of HMF dietary intake by the consumption of coffee (ground + soluble) by point estimate approach considering relative contribution of each type of coffee.

Type of coffee	Consumption coffee, g/capita/day	Relative consumption, %	Median HMF content, mg/kg	Intake	
				HMF, mg/day	70 kg (adult), µgHMF/bw/day
Torrefacto	8.57	1.44	367.61	0.05	0.65
Natural	8.57	34.76	127.87	0.38	5.44
Blend	8.57	54.92	640.92	3.02	43.10
Soluble	8.57	8.89	2385.77	1.82	25.96
Total				5.26	75.15

Table 5

Estimation of HMF dietary intake by the consumption of coffee (ground + soluble) by point estimate approach considering relative contribution of each type of coffee at high consumption habits (percentile 95).

Type of coffee	Consumption coffee, g/capita/day	Relative consumption, %	P(95) HMF content, mg/kg	Intake	
				HMF, mg/day	70 kg (adult), µgHMF/bw/day
Torrefacto	8.57	1.44	1950.15	0.24	3.44
Natural	8.57	34.76	172.11	0.51	7.33
Blend	8.57	54.92	1027.44	4.84	69.09
Soluble	8.57	8.89	3912.06	2.98	42.57
Total				8.57	122.42

take) of 1600 and 1300 µg/person/day for HMF and FA, respectively. Previously, EFSA has already established an ADI value of 0.5 mg/kg bw for furfural, but not references are written for HMF. Average HMF dietary exposure was 5.26 mg/day which is 10-fold above the threshold of concern stated for EFSA, and only taking into account the contribution of coffee.

4. Conclusions

HMF, HMFA, FA are widely distributed in roasted ground coffee and soluble coffee, but level of furfural is low and rather variable being not representative of the product. Since coffee is the main food commodities contributing to the total dietary intake of HMF, it was better identified its distribution according to the type of coffee. Mean values of 110, 625, 1734, and 2480 mg HMF/kg were recorded for natural ground coffee, blend ground coffee, torrefacto ground coffee, and soluble coffee, respectively. Then, due to the huge variability on levels of HMF in coffee it is necessary to clarify the consumption of coffee regarding the type of roasted coffee since estimation of contribution of coffee to dietary intake of HMF might be greatly affected. An average level of 9.59 mg HMF/day was obtained without correction and 5.26 mg/day was calculated taking into account the specific contribution of each type of coffee to consumption. Although there is not regulation or recommendations for limit of HMF content in foods, apart from honey for adulteration issues, based on consideration of consumer's health protection due to biotransformation to SMF, this study could serve as basis of further discussions of food experts and risk managers in Spain and Europe. Recently, Davies et al. (2009) developed a method to measure HMF Schiff base adduct to N-terminal valine in haemoglobin that could be used as a biomarker of exposure in future. But, measurement of urinary metabolites of HMF, like HMFA, has also shown to be alternative biomarker of HMF exposure in humans (Husøy et al., 2008). All at all, preventive strategies for reducing exposure of HMF from coffee should be further investigated

after evaluation of its occurrence in the different classes of coffee present in the market.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest

Acknowledgements

We are grateful to S. de la Peña, D. Gómez for technical assistance and A. Hernando (Federación Española del Café) for providing technical information on coffee consumption habits in Spain. Consejería de Educación y Ciencia (Comunidad Autónoma de Madrid) is thanked for supporting a predoctoral grant for G. Arribas-Lorenzo. This research was supported by a Scientific Research Programme of the Comunidad de Madrid (ANALISYC, S-505/AGR-0312).

References

- Antal Jr., M.J., Mok, W.S., Richards, G.N., 1990. Mechanism of formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde from D-fructose and sucrose. *Carbohydr. Res.* 199, 91–109.
- Bakhiya, N., Monien, B., Frank, H., Seidel, A., Glatt, H., 2009. Renal organic anion transporters OAT1 and OAT3 mediate the cellular accumulation of 5-sulfoxymethylfurfural, a reactive nephrotoxic metabolite of the Maillard product 5-hydroxymethylfurfural. *Biochem. Pharmacol.* 78, 414–419.
- Davies, R., Hedebrant, U., Athanassiadis, I., Rydberg, P., Törqvist, M., 2009. Improved method to measure aldehyde adducts to N-terminal valine in haemoglobin using 5-hydroxymethylfurfural and 2, 5-furandialdehyde as model compounds. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1950–1957.
- Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., Navarro, M.P., Morales, F.J., 2007. Maillard reaction indicators in diets usually consumed by adolescent population. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 341–351.
- EFSA, 2005. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on request from the commission related to flavouring group evaluation 13: furfuryl and furan derivatives with and without additional side-chain substitutes and heteroatoms from chemical group 14 (commission regulation (EC) No. 1565/2000 of 18 July 2000). *EFSA J.* 215, pp. 1–73.
- Feather, M.S., Harris, J.F., 1973. Dehydration reactions of carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem.* 28, 161–224.
- Federación Española del Café (FEC), 2009. Información estadística sectorial 2008, Seville, Spain.
- Glatt, H., Sommer, Y., 2006. Health risks of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. In: Skog, K., Alexander, J. (Eds.), *Acrylamide and Other Health Hazardous Compounds in Heat-Treated Foods*. Woodhead Publishing, Cambridge, England.
- Husøy, T., Haugen, M., Murkovic, M., Jöbstl, D., Stølen, L.H., Bjellaas, T., Rønningborg, C., Glatt, H., Alexander, J., 2008. Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3697–3702.
- Janowski, C., Glaab, V., Samimi, E., Schlatter, J., Eisenbrand, G., 2000. 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity. DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food Chem. Toxicol.* 38, 801–809.
- Kanjahn, D., Jarms, U., Maier, H.G., 1996. Hydroxymethylfurfural and furfural in coffee and related beverages. *Deut. Lebensm.-Rundsch.* 92, 328–331.
- Kroh, L.W., 1994. Caramelisation in food and beverages. *Food Chem.* 51, 373–379.
- López-Galilea, I., De la Peña, M.P., Cid, C., 2007. Correlation of selected constituents with the total antioxidant capacity of coffee beverages: influence of brewing procedure. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6110–6117.
- MAPA, 2009. La alimentación en España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación Ed, Madrid, Spain.
- Morales, F.J., 2009. Hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. In: Stadler, Richard H., Lineback, David R. (Eds.), *Process-Induced Food Toxicants*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 135–174.
- Murkovic, M., Bornik, M.A., 2007. Formation of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) and 5-hydroxymethyl-2-furoic acid during roasting of coffee. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 390–394.
- Murkovic, M., Pichler, N., 2006. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 842–846.
- NTP, 2008. Toxicology and carcinogenesis studies of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural (CAS No. 67-47-0) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (gavage studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Report Series* <<http://ntp.niehs.nih.gov/>>.
- O'Brien, J., Morrissey, P.A., 1989. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard reaction in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 28, 211–248.
- Rufián-Henares, J.A., de la Cueva, S.P., 2008. Assessment of hydroxymethylfurfural intake in the Spanish diet. *Food Addit. Contam. Part A* 25, 1306–1312.
- Rufián-Henares, J.A., Delgado-Andrade, C., Morales, F.J., 2006. Application of a fast high-performance liquid-chromatography method for simultaneous determination of furanic compounds and glucosylisomaltol in breakfast cereals. *J. AOAC Int.* 89, 161–165.
- Sánchez-González, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F., 2005. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso, and filter). *Food Chem.* 90, 133–139.
- Surh, Y.J., Tannenbaum, S.R., 1994. Activation of the Maillard reaction product 5-(hydroxymethyl)-furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 313–318.
- Teubner, W., Meinel, W., Florian, S., Kretzschmar, M., Glatt, H., 2007. Identification and localization of soluble sulfotransferases in the human gastrointestinal tract. *Biochem. J.* 404, 207–215.
- Theander, O., 1981. Maillard reaction in food. Chemical, physiological and technological aspects. In: Eriksson, C. (Ed.), *Progress in Food Nutrition and Science*, vol. 5. Pergamon Press, Oxford, New York, p. 471.
- Zhang, X.M., Chan, C.C., Stamp, D., Minkin, S., Archer, M.C., Bruce, W.R., 1993. Initiation and promotion of colonic aberrant crypt foci in rats by 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in thermolyzed sucrose. *Carcinogenesis* 14, 773–775.

Capítulo 5

Puesta a punto, validación y acreditación (norma UNE EN ISO/IEC 17025) de un método analítico para la determinación de acrilamida en alimentos

5.1. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo es validar una metodología analítica para la determinación de acrilamida en patatas fritas, galletas y panes que permita cumplir con los estándares de competencia técnica requeridos por la Norma ISO/IEC 17025. El objetivo secundario es incorporar el ensayo en un laboratorio de referencia de análisis de alimentos con el fin de que sea uno de los laboratorios pioneros en el análisis de acrilamida acreditado por ENAC.

5.2. INTRODUCCIÓN

5.2.1. Norma Internacional UNE EN ISO/IEC 17025

La norma internacional UNE EN ISO/IEC 17025: “Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración” contiene todos los requisitos que deben cumplir los laboratorios de calibración y de ensayo para demostrar la implantación de un sistema de gestión de calidad, disponer de la competencia técnica y capacidad de generar resultados válidos. La norma se refiere a calibración y ensayo utilizando métodos normalizados, no normalizados y métodos desarrollados en el laboratorio. Su uso facilita la cooperación entre laboratorios y otros organismos, y ayudar al intercambio de información y experiencia así como a la armonización de normas y procedimientos (UNE-EN ISO/IEC 17025:2005).

En virtud del Reglamento (CE) 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo (Reglamento (CE) Nº 882/2004), los laboratorios de control oficial de alimentos deben estar acreditados de acuerdo a los criterios generales establecidos en la norma ISO 17025, como es el caso del LSP.

5.2.2. Validación del método analítico

En la ISO 17025 se define la validación como “la confirmación por examen y la provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico propuesto”. Todos los procedimientos y métodos de ensayo estándares y no estándares, incluyendo aquéllos desarrollados por el laboratorio, se validan para asegurar que dichos métodos y procedimientos sean compatibles con los usos pretendidos y relevantes para los requerimientos de ISO/IEC 17025 así como también del cliente. La validación será tan extensa

como sea necesaria para cumplir con las necesidades de la aplicación determinada o el campo de aplicación. Gracias a la validación se consigue un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados, así como la adecuación del método y sus parámetros de calidad a las necesidades requeridas específicamente por el laboratorio en cuestión.

5.3. PARTE EXPERIMENTAL

5.3.1. Optimización del método analítico

Partiendo del método analítico desarrollado y validado internamente en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), se puso a punto la técnica para poder implantarla en el LSP con las nuevas condiciones instrumentales que requieren de los criterios de la Decisión Europea 2002/657/EC.

Con objeto de conseguir una elevada señal, sensibilidad y resolución cromatográfica, a la vez que un método suficientemente preciso, se procedió a la optimización de las condiciones de ionización y detección. Posteriormente, se optimizaron las variables influyentes del sistema cromatográfico, tanto instrumentales como experimentales. Como criterio para seleccionar los valores óptimos de las variables en estudio se consideraron tanto la resolución como el área de pico y la relación señal/ruido (S/N).

5.3.2. Optimización de los parámetros del espectrómetro de masas

La optimización de las condiciones del MS y MS/MS con analizador triple cuadrupolo se realizó mediante infusión directa de una disolución de patrón de acrilamida de 1000 ppb en agua milli-Q. Se utilizó una bomba de jeringa conectada directamente a la interfase *electrospray*, a una velocidad de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Se adquirió el espectro de MS en modo barrido (*scan* entre 10 y 100 m/z), estableciéndose el ión m/z 72, $[M+H]^+$, como precursor. La acrilamida fue detectada en modo ionización positivo (ESI+).

- Optimización del voltaje del capilar del ión precursor

Una vez establecido el ión precursor, el programa informático del equipo propuso el voltaje del capilar óptimo, siendo éste de 36 V (Figura 13).

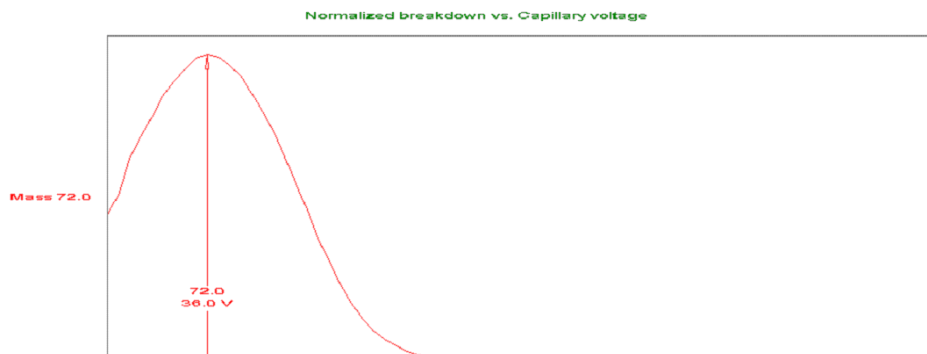


Figura 13. Voltaje del capilar óptimo para el ión precursor 72.

- Optimización de las transiciones de fragmentación y de las energías de colisión

Tras aislar el ión precursor, se estudiaron las mejores transiciones, en modo monitorización de reacciones múltiples (MRM). Éstas fueron m/z 72>55, 72>54, 72>44 para la acrilamida, y m/z 75>58 para el patrón interno $^{13}\text{C}_3$ -acrilamida. La energía de colisión fue optimizada para cada transición MRM.

En la figura 14 se muestran las transiciones encontradas para la acrilamida junto con sus energías de colisión.

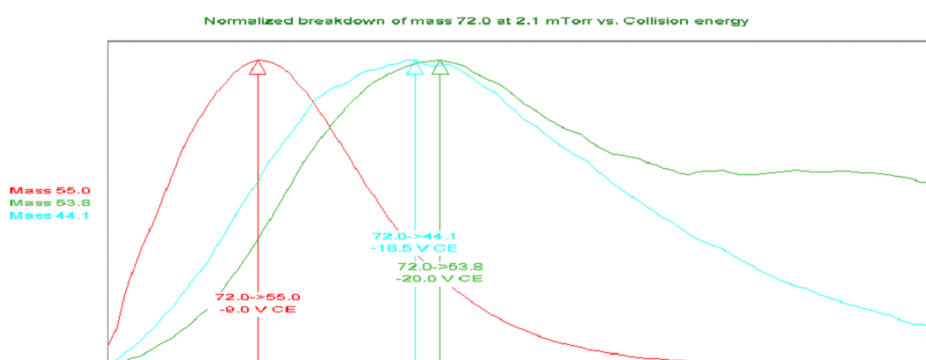


Figura 14. Transiciones de acrilamida y energías de colisión.

Con objeto de llevar a cabo la confirmación inequívoca de los analitos, la Decisión Europea 2002/657/EC (Decisión de la Comisión 2002/657/EC) establece un sistema de identificación por puntos para interpretar los datos, basado en el uso de MS mediante análisis de los

fragmentos. La asignación de puntos se establece adjudicando 1 punto por cada ión precursor y 1,5 por cada ión producto obtenido. Se establecieron como iones producto m/z 55 (a 9 V) y m/z 54 (a 20 V) ya que fueron los que alcanzaron mejor sensibilidad. Teniendo en cuenta este criterio, se lograron 4 puntos de identificación. Las transiciones m/z 72>55 y m/z 75>58 (energía de colisión 10 V) fueron empleadas para la cuantificación de la concentración y la m/z 72>54 para la identificación del compuesto.

- Optimización de la presión del nebulizador

Una vez optimizadas las transiciones, se procedió con el resto de variables que afectan a la fuente de ionización. Se comenzó con la presión del nebulizador, escogiendo un intervalo de trabajo comprendido entre $1,4 \times 10^5$ y $4,1 \times 10^5$ Pa (máximo instrumental).

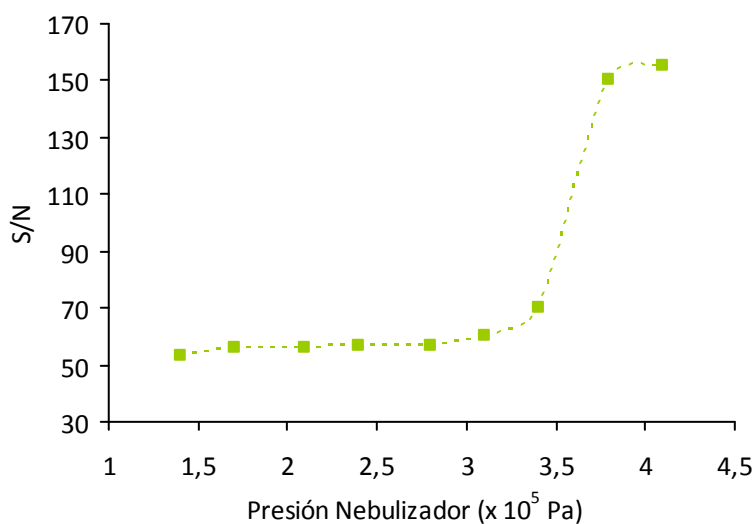


Figura 15. Influencia de la presión del nebulizador sobre la relación S/N.

Como se muestra en la Figura 15, los mejores resultados aparecen a una presión del nebulizador de $4,1 \times 10^5$ Pa.

- Optimización de la temperatura del gas de secado (N_2)

El siguiente factor a considerar en el estudio es la temperatura del gas de secado. Para llevar a cabo esta optimización se estudió un intervalo comprendido entre 160 y 400 °C, con incrementos de 20 °C, fijándose la variable optimizada hasta ahora. A la vista de los resultados (Figura 16), se observa que la temperatura óptima para el gas de secado, con un valor máximo para la relación S/N, se encuentra comprendida en el rango 340-400 °C.

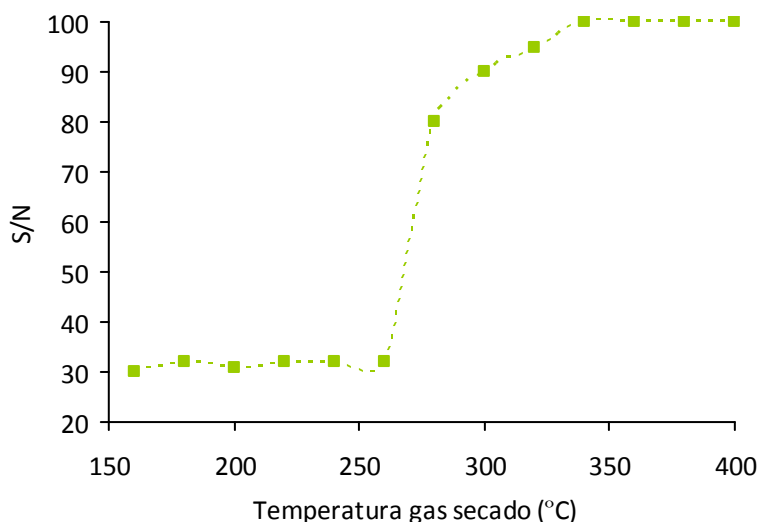


Figura 16. Influencia de la temperatura del gas de secado sobre la relación S/N.

- Optimización del voltaje de la aguja de la fuente de ionización

Finalmente se evaluó el voltaje de la aguja mediante variación aleatoria en el intervalo comprendido entre 3000 y 4000 V, a intervalos de 1 minuto, durante el cual se monitorizó la señal m/z 72. El voltaje que mejor señal proporcionaba y que daba lugar a una señal más estable era el de 4000 V.

En la Tabla 17, se recogen los parámetros optimizados correspondientes al MS/MS para la detección de acrilamida.

Presión gas nebulización	4,1 x10 ⁵ Pa
Temperatura gas nebulización	60 °C
Voltaje <i>shield</i>	400 V
Voltaje aguja	4000 V
Presión gas secado	2,1 x10 ⁵ Pa
Temperatura gas secado	400 °C
Presión gas colisión argón	2,1 mTorr
Voltaje capilar	36 V
Ión precursor acrilamida	72
Iones producto acrilamida	55 (9 V) y 54 (20 V)
Ión precursor ¹³ C ₃ -acrilamida	75
Ión producto ¹³ C ₃ -acrilamida	58 (10 V)

Tabla 17. Valores seleccionados para la detección y cuantificación de acrilamida.

5.3.3. Optimización de la separación cromatográfica

- Elección de la columna cromatográfica

Aunque últimamente algunos grupos de investigación han optado por un relleno de carbono grafitico poroso, como es el caso de la columna Hypercarb, la mayoría de los métodos de separación cromatográfica descritos hasta la fecha (ver Introducción) utilizan columnas de fase inversa de sílica especialmente diseñada para analitos altamente polares.

Inicialmente se estudiaron las columnas disponibles en el laboratorio para compuestos muy polares. La primera fue una Atlantis C₁₈ de 150 x 4,6 mm y 3 µm de tamaño de partícula (Waters®). Con esta columna no se obtuvo una buena resolución del pico cromatográfico por lo que se procedió a probar una segunda, la columna Pursuit C₁₈ 150 x 4,6 mm con un tamaño de partícula de 5 µm (Varian). Al igual que con la anterior, el cromatograma obtenido no mostraba una buena resolución ni separación del pico cromatográfico de la acrilamida con respecto a los interferentes. Por último se probaron dos columnas más, una Inertsil ODS-3 C₁₈ 150 x 3,0 mm de 5 µm y otra de 150 x 2,1 mm de 5 µm (GL Sciences). Usando ambas columnas, la morfología del pico mejoró considerablemente siendo finalmente la de menor diámetro interno la que mejor resolución y sensibilidad mostraba. Las excelentes propiedades de los rellenos Inertsil se deben en gran medida a la extraordinaria calidad de las partículas de sílice de elevada área superficial, especialmente manipulada para proporcionar una elevada cobertura de fases enlazadas octadecil. Como resultado, la columna proporciona una excelente forma de pico utilizando eluyentes habituales y trabajando a baja presión.

- Optimización de la fase móvil

El estudio se llevó a cabo trabajando en modo isocrático y la fase móvil ensayada fue agua y ácido fórmico 0,2% (A): acetonitrilo (B). Se evaluó el porcentaje de la disolución acuosa de ácido fórmico. Con este propósito se estudió un rango comprendido entre 50:50 (v/v) hasta 100:0 (v/v), con incrementos del 10%. De los resultados obtenidos se observó que la mejor resolución y señal la mostraba la fase móvil con 100% de A (Figura 17), es decir, sin modificador orgánico. Se mantuvo un flujo constante de 0,2 ml/min durante todo el desarrollo cromatográfico.

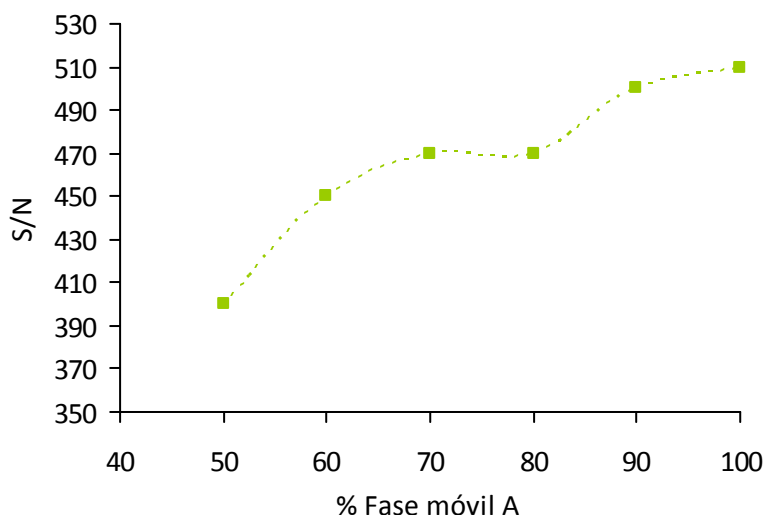


Figura 17. Influencia del porcentaje de fase móvil A sobre la relación S/N.

- Optimización del volumen y el modo de inyección

Para optimizar la cantidad de muestra inyectada así como el modo de inyección, se ensayaron diferentes volúmenes: 20 y 50 μL y tres modos de inyección: *full loop*, *partial loop* y *micro pick-up*. El *loop* empleado fue de 100 μL . Los resultados evidenciaron (Figura 18) que el modo *full loop* desarrollaba un pico cromatográfico más ancho, con la consiguiente pérdida de resolución y sensibilidad. Asimismo, la inyección de 20 μL en *micro pick-up* mostró una S/N prácticamente igual que inyectando más volumen (50 μL) en *partial loop*.

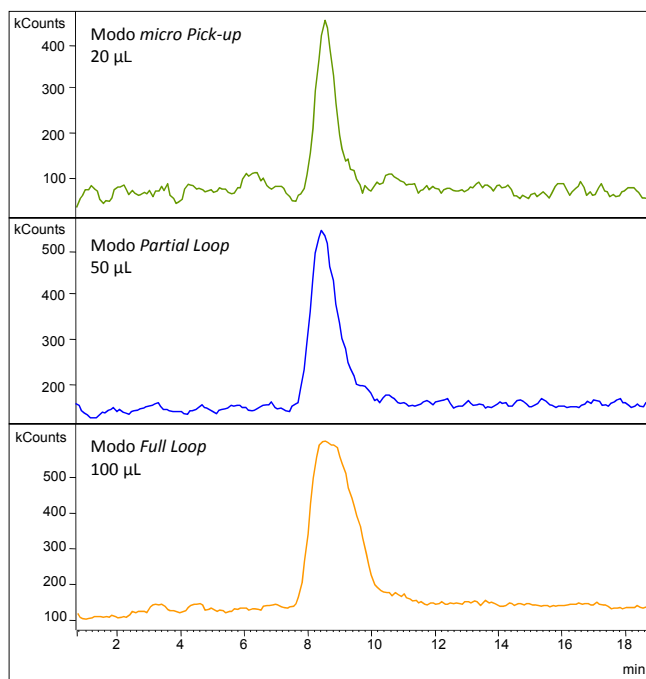


Figura 18. Influencia del volumen y el modo de inyección sobre un patrón de acrilamida empleando un *loop* de 100 μL .

A partir de estos resultados, se intentó mejorar aún más la señal empleando para ello un *loop* mayor (200 μL) y descartando el modo de inyección *full loop*. En la Figura 19, se recogen los cromatogramas obtenidos para un patrón de acrilamida y las distintas formas de inyección ensayadas.

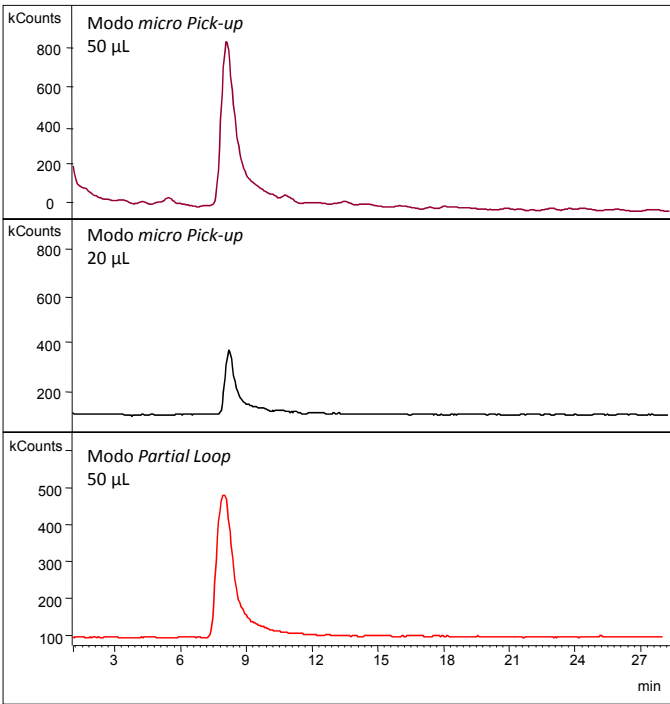


Figura 19. Influencia del volumen y el modo de inyección sobre un patrón de acrilamida empleando un *loop* de 200 μL .

Finalmente, los mejores resultados correspondieron a un volumen de inyección de 50 μL en modo *micro pick-up* empleando un *loop* de 200 μL .

A continuación se muestran las condiciones óptimas para la separación cromatográfica (Tabla 18) y un cromatograma obtenido (Figura 21).

Columna	Inertsil ODS-3, 150 x 2,1 mm (5 μm)
Temperatura columna	32 $^{\circ}\text{C}$
Volumen de inyección	50 μL (<i>micro pick-up</i>)
Composición fase móvil	0,2% ácido fórmico en agua
Caudal fase móvil	0,2 ml/min
Tiempo cromatograma	25 min

Tabla 18. Valores óptimos para la separación cromatográfica.

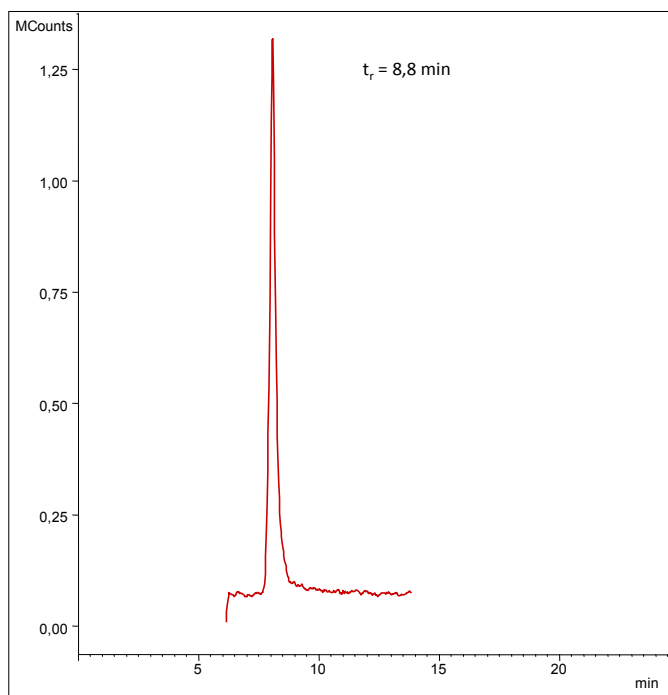


Figura 20. Cromatograma de un patrón de acrilamida (m/z 55) en las condiciones óptimas del método.

- Optimización del proceso de extracción

A fin de estudiar la posible influencia de la adición de la solución salina Carrez ($K_4[Fe(CN)_6]$ + $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) en el procedimiento de extracción, se procedió a realizar ensayos de recuperación. Se emplearon diferentes volúmenes de Carrez (25, 100 y 750 μ L) sobre 0,45 g de muestras blanco dopadas de acuerdo al método descrito en el apartado 5.3.4.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 19, en la que puede apreciarse que el volumen de 25 μ L proporciona los mejores valores de recuperación en el proceso de extracción.

	Recuperación (%)		
	25 μ L Carrez	100 μ L Carrez	750 μ L Carrez
FAPAS de Galleta	97 \pm 2	69 \pm 2	62 \pm 1
Patata dopada	99 \pm 1	75 \pm 1	50 \pm 3
Galleta dopada	100 \pm 2	71 \pm 3	53 \pm 3
Pan dopado	98 \pm 2	71 \pm 4	68 \pm 1

Tabla 19. Recuperaciones obtenidas al realizar la extracción ($n=3$) con los diferentes volúmenes de Carrez sobre un material de referencia de galletas (FAPAS) y sobre blanco de muestras dopadas con concentraciones conocidas de acrilamida.

5.3.4. Metodología

El método finalmente empleado se describe a continuación (Figura 21):

Se parte de 0,45 g de muestra previamente triturada y homogenizada, se añaden 4,9 mL de agua milli-Q y 50 μL de patrón interno ($^{13}\text{C}_3$ -acrilamida) y se agita 1 min. en vórtex. Seguidamente se añaden 25 μL de Carrez I y otros 25 μL de Carrez II, se vuelve a agitar 10 s en vórtex y se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min. Se toman 1,2 mL del sobrenadante y se congela durante 1 hora. Pasado ese tiempo, se descongela y se centrifuga a 13.000 rpm durante 5 minutos. A continuación, 1 mL de muestra se pasa a través de los cartuchos Strata-X, previamente activados, desechándose las 7 primeras gotas y recogiendo el resto en un vial para introducirlo en el equipo de LC-MS/MS.

Por extrapolación en las correspondientes rectas de calibrado se determina la concentración de acrilamida.

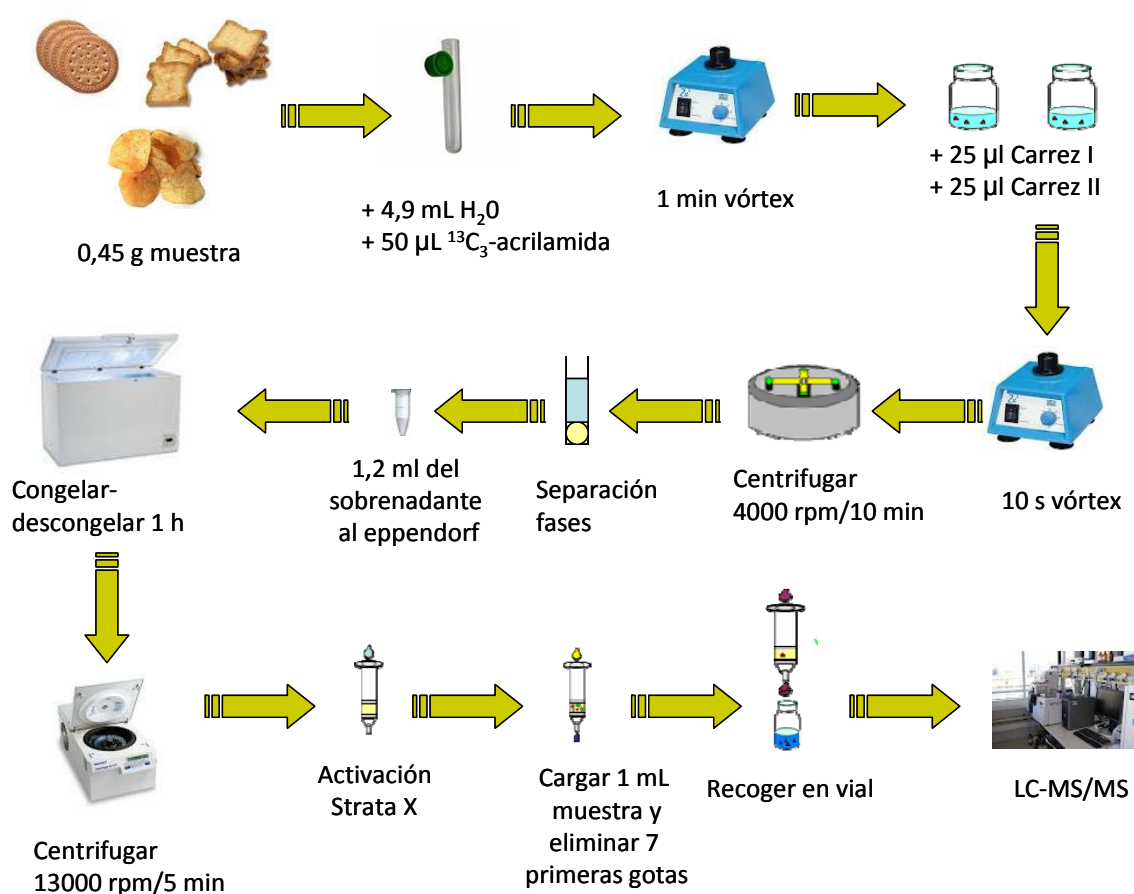


Figura 21. Esquema correspondiente al método analítico.

5.3.5. Validación del método analítico

El procedimiento de validación del método fue llevado a cabo siguiendo el sistema de calidad implantado en el LSP según Norma ISO 17025 así como de acuerdo a los criterios de funcionamiento de los métodos de análisis y de interpretación de resultados según la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE.

Para la validación del método analítico se determinan los siguientes criterios de calidad: linealidad, LOD, LOQ, precisión, exactitud, especificidad/selectividad e incertidumbres.

- Linealidad y rango de linealidad

La linealidad es la capacidad de un método analítico para obtener resultados proporcionales a las concentraciones del analito dentro de un intervalo de trabajo determinado. Se expresa con una ecuación, ajustada por mínimos cuadrados, de la forma:

$$y = bx + a$$

donde:

x: Concentración del analito / concentración del patrón interno.

y: Relación entre el área de integración del pico correspondiente a la transición mayoritaria / y el pico del patrón interno.

Las rectas de calibrado fueron elaboradas a partir de disoluciones acuosas del patrón de acrilamida, a los niveles de concentración adecuados. Diariamente, y a lo largo de todo el proceso de validación, se realizó una curva de calibrado para cada matriz con al menos cinco niveles de calibración además del cero en el rango de medida (Figura 22). Todas las disoluciones contenían una concentración de patrón interno de acrilamida, $^{13}\text{C}_3$ -acrilamida, de 100 ppb.

La linealidad se evaluó estadísticamente siguiendo los siguientes criterios:

- Coeficiente de correlación lineal, considerando lineal el calibrado si $r > 0,99$.
- Valores residuales máximos del 20%.
- Coeficiente de linealidad $> 95\%$.

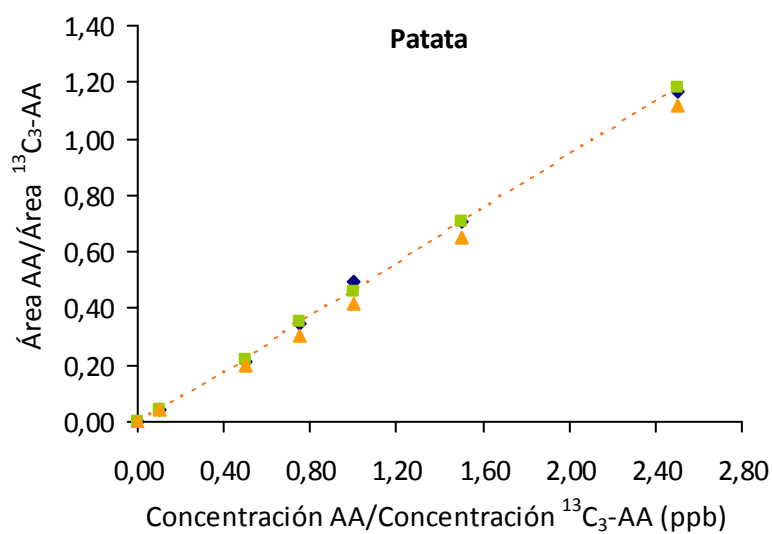
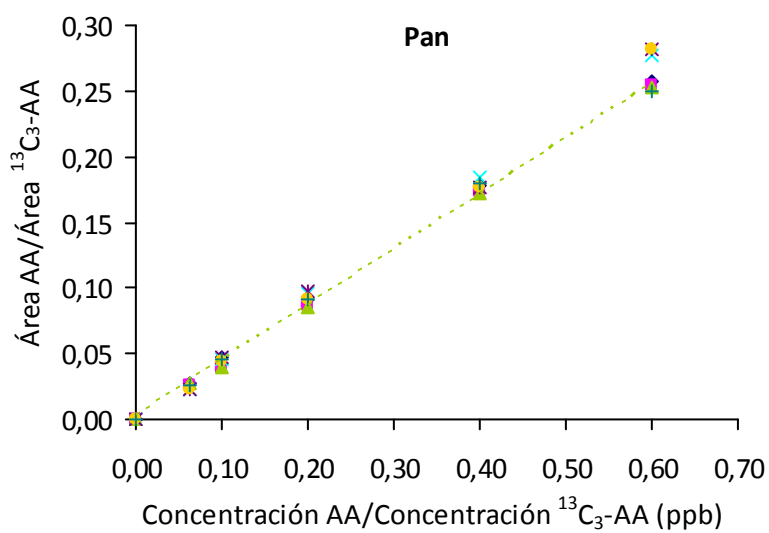
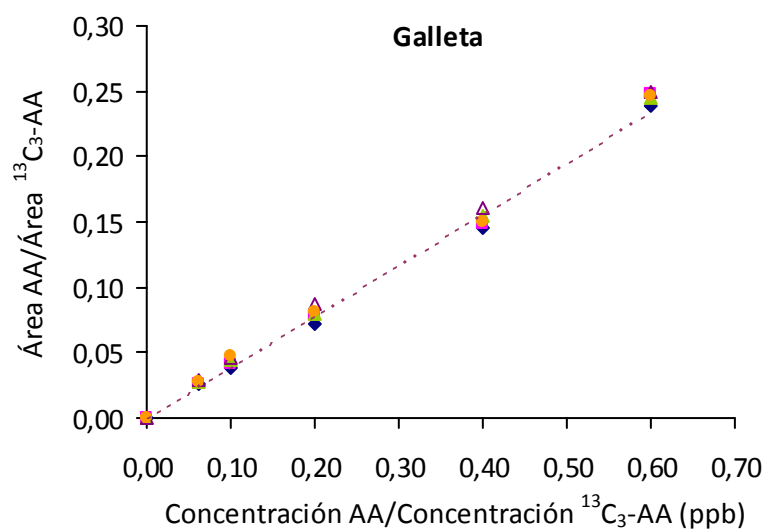


Figura 22. Rectas de calibrado. AA: acrilamida.

El rango del método es el intervalo entre los niveles superior e inferior, incluyendo estos valores, en el que se ha demostrado un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

Los parámetros de calibración medios obtenidos se muestran en la Tabla 20.

	Coefficiente de regresión, r	Coefficiente de linealidad (%)	Intervalo de linealidad (µg/kg)
Patata	0,9997	99	111-2778
Galleta	0,9978	96	70-667
Pan	0,9994	98	70-667

Tabla 20. Coeficiente de regresión, coeficiente de linealidad e intervalo de linealidad de acrilamida en cada matriz alimentaria.

- Límite de detección y límite de cuantificación

El LOD se define como la concentración más baja de analito que puede ser detectada en las condiciones experimentales establecidas. El LOD se ha calculado mediante el análisis por triplicado de una adición del patrón de acrilamida, con suficiente concentración para detectarla e identificarla, sobre cada una de las matrices de estudio.

El LOQ, también conocido como límite de determinación, estrictamente es la concentración más baja de analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión y exactitud. Con los datos obtenidos de precisión y exactitud se ha determinado el límite de cuantificación para cada matriz. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 21.

	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
Patata	70	111
Galleta	50	70
Pan	50	70

Tabla 21. LOD y LOQ de las diferentes matrices validadas.

- Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia de los resultados obtenidos cuando el método se aplica repetidas veces a múltiples porciones de una muestra homogénea.

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia.

Se realizan los siguientes ensayos de precisión:

1. En matriz exenta de analito, añadiendo cantidades conocidas de patrón de acrilamida (método de las adiciones).
2. En muestras comerciales. La precisión se va a calcular a partir de los estudios de repetibilidad y precisión intermedia.

Repetibilidad

La repetibilidad o precisión intradía expresa la precisión del método de análisis cuando es realizado por el mismo analista bajo condiciones iguales en lo relativo a: reactivos, equipos y cortos intervalos de tiempo. Por tanto, mide las variaciones dentro de un mismo laboratorio. La repetibilidad del método se determina a través de la desviación estándar relativa (RSD).

1. Matriz exenta de analito.

Fue evaluada mediante adiciones de acrilamida sobre las matrices blancas de estudio (patata, pan, galleta) a tres niveles de concentración dentro del rango lineal de trabajo. Se prepararon cinco replicados independientes de cada una de ellas en el mismo día y manteniendo las mismas condiciones.

En la Tabla 22 se muestran los valores obtenidos, para las distintas concentraciones de acrilamida en las matrices ensayadas.

	Acrilamida (µg/kg)	RSD (%)	n
Patata	111	5	5
	1111	2	5
	2778	1	5
Pan	70	5	5
	222	3	5
	667	5	5
Galleta	70	5	5
	222	4	5
	667	4	5

Tabla 22. Repetibilidad del método analítico.

Con objeto de garantizar la ausencia de acrilamida y evaluar el ruido se sometió una muestra de cada matriz sin fortificar (blanco de muestra) a todo el procedimiento analítico. No se observaron picos que pudieran corresponder al del analito. La Figura 23 recoge los cromatogramas obtenidos para el ejemplo de un blanco de pan y una muestra de pan dopada.

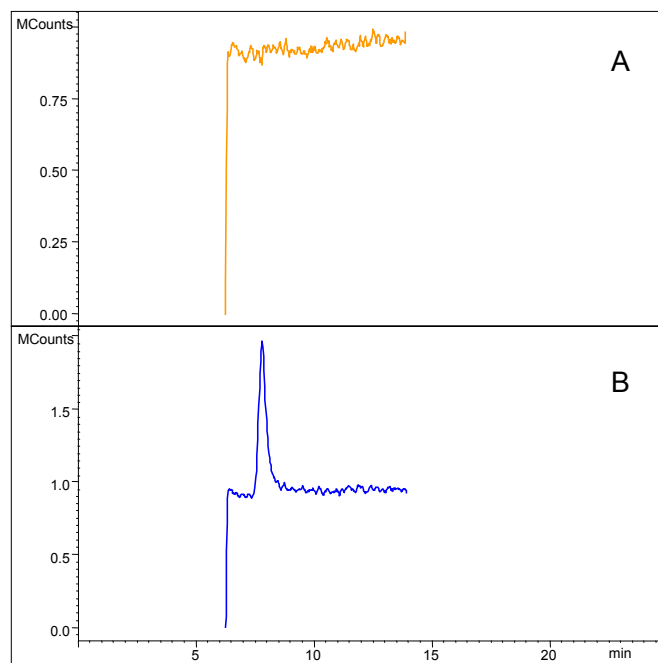


Figura 23. Cromatogramas obtenidos en las condiciones óptimas para el análisis de acrilamida (m/z 55) mediante LC-MS/MS en una muestra de pan, sin dopar (blanco de muestra) (A) y dopada (B).

2. Muestras reales

Este ensayo se realizó analizando 2 muestras comerciales de patatas fritas con diferente concentración de acrilamida. De esta manera se aseguró que el efecto del procesado de las patatas no interfería en el proceso de extracción. Se realizaron 5 repeticiones en el mismo día.

	Acrilamida ($\mu\text{g/kg}$)	RSD (%)	n
Muestra 1	181	3	5
Muestra 2	370	3	5

Tabla 23. Repetibilidad de muestras comerciales de patatas fritas.

Precisión intermedia

Expresa la precisión del método de análisis cuando es realizado por diferentes analistas en un mismo laboratorio bajo condiciones ligeramente diferentes, entre las que cabe destacar: distinta temperatura ambiental, nuevos envases de reactivos y disolventes, curvas de calibración diferentes, etc. Por tanto, mide las variaciones intralaboratorio, por distintos analistas o diferentes equipos, aplicando el mismo procedimiento analítico.

Para evaluar la precisión intermedia o interdía (expresada como RSD), se ha realizado el ensayo en tres días diferentes, durante un periodo de 3 meses. Los resultados se muestran en las Tablas 24 y 25.

	Acrilamida (µg/kg)	RSD (%)	n
Patata	111	6	15
	1111	4	15
	2778	1	15
Pan	70	7	15
	222	5	15
	667	5	15
Galleta	70	8	15
	222	5	15
	667	4	15

Tabla 24. Precisión intermedia del método analítico.

	Acrilamida (µg/kg)	RSD (%)	n
Muestra 1	181	1	15
Muestra 2	370	5	15

Tabla 25. Precisión intermedia de muestras comerciales de patatas fritas.

- Exactitud

La exactitud se define como el grado de coincidencia entre el valor obtenido de una concentración o cantidad medida y el valor real de la misma.

Se estima mediante el análisis tanto de materiales de referencia como de muestras adicionadas en ensayos de recuperación. Para evaluar la veracidad del método propuesto se utilizó la siguiente expresión:

$$R \% = \frac{V_{obtenido}}{V_{real}} \times 100$$

Análisis de materiales de referencia

Se aplicó el procedimiento analítico a dos materiales de referencia de pan tostado comparando el valor medio obtenido en condiciones de precisión intermedia (7 réplicas/día, durante dos días alternos) con el valor considerado como real. Los resultados se muestran a continuación.

	Valor real (µg/kg)	Valor obtenido (µg/kg)	R %
Muestra 1	980	987	101
Muestra 2	271	284	105

Tabla 26. Estudio de exactitud para el método propuesto referido al análisis de materiales de referencia de pan tostado.

Análisis de muestras adicionadas

Los ensayos de recuperación se llevaron a cabo a partir de adiciones de cantidades conocidas de analito a las matrices blancas de estudio. El estudio se realizó mediante análisis repetidos (5 réplicas durante 3 días diferentes). Se aprovecharon los mismos datos que los utilizados para estimar la precisión (Tabla 24).

Las recuperaciones, con respecto al valor real, tanto en el análisis de los dos materiales de referencia como en las muestras fortificadas, están dentro de los márgenes de tolerancia aceptados (70-110%).

	Valor real (µg/kg)	Valor obtenido (µg/kg)	R %
Patata	111	106	95
	1111	1101	99
	2778	2746	99
Galleta	70	68	97
	222	230	104
	667	646	97
Pan	70	64	91
	222	203	92
	667	634	95

Tabla 27. Estudio de exactitud para el método propuesto referido al análisis de muestras adicionadas.

- Selectividad

La selectividad es la capacidad de detectar al analito sin interferencias de otros compuestos, tanto de componentes de la matriz como de impurezas. Con el objetivo de evaluar la especificidad se tuvo en cuenta:

- Ión molecular característico de la acrilamida (m/z 72).
- Tiempo de retención del analito.
- Fragmentación del ión molecular. Obtención del correspondiente espectro de masas cumpliendo las tolerancias máximas permitidas para las abundancias relativas de los iones producto característicos (Decisión de la Comisión 2002/657/CE).

Teniendo en cuenta tales criterios, se pudo confirmar a lo largo de todo el proceso de validación, para las matrices de estudio en las condiciones de análisis utilizadas, la ausencia de interferentes.

- Incertidumbres

La Guía EURACHEM define incertidumbre como el parámetro asociado con el resultado de una medida que caracteriza la dispersión de los valores que se pueden atribuir razonablemente al analizado (EURACHEM Guide).

La incertidumbre de un resultado puede originarse por diferentes causas, en nuestro caso se tuvieron en cuenta las siguientes componentes:

- Incertidumbre de inexactitud del valor de referencia

- Incertidumbre de repetibilidad del ensayo
- Incertidumbre de heterogeneidad o debida a las etapas analíticas

Los parámetros para la estimación de incertidumbre fueron:

- Incertidumbre estándar

Este componente está expresado como una desviación estándar.

- Incertidumbre estándar combinada

Para un resultado de la medición, la incertidumbre total o incertidumbre estándar combinada es una estimación de la desviación estándar igual a la raíz cuadrada del total de la varianza obtenida por la combinación de todos los componentes de la incertidumbre.

- Incertidumbre expandida

Provee un intervalo dentro del cual el valor del analito es dado con un alto nivel de confianza. La incertidumbre expandida se obtiene multiplicando la incertidumbre estándar combinada por un factor k. La elección del factor k depende del nivel de confianza deseado (para un nivel de confianza del 95%, k es igual a 2).

Teniendo en cuenta estos aspectos, la incertidumbre para cada matriz se calcula con los datos de precisión y exactitud. La incertidumbre relativa experimentó variaciones entre el 2 y el 18%. Los cálculos se desarrollaron de acuerdo al documento G-ENAC-09, “Guía para la expresión de la incertidumbre en los ensayos cuantitativos”.

5.3.6. Muestras reales

Una vez se ha realizado la validación de un método analítico, la funcionalidad del mismo es su aplicación para el análisis de muestras comerciales. Éstas fueron recogidas, a través de los Inspectores de Consumo de la Comunidad de Madrid, en comercios de los diferentes distritos de la capital así como en Mercamadrid. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. En cada secuencia analítica, las muestras fueron inyectadas después de las correspondientes curvas de calibración y a continuación los blancos de reactivo y de muestra, además de una muestra fortificada en el límite de cuantificación.

De forma periódica, se procedió a la realización de controles de calidad internos mediante matrices blancas dopadas con cantidades conocidas de acrilamida y mediante el análisis de materiales de referencia. La recuperación de estos controles de calidad se consideró satisfactoria para un rango comprendido entre un 70 y un 110%, además de una desviación de

los valores medios no superior al 20%. Si se cumplen estas condiciones se puede asegurar que el método validado ha sido correctamente aplicado.

La confirmación de la identidad de la acrilamida se calcula a partir de la intensidad relativa entre transiciones. De tal manera que se selecciona un ión de cuantificación, que suele ser el más intenso (m/z 55) y un ión de confirmación o cualificación (m/z 54). Las intensidades relativas de los iones detectados, expresadas como porcentaje de la intensidad del ión más intenso o de la transición, corresponderán a las del patrón de calibración, bien de soluciones del patrón de calibración, bien de muestras enriquecidas, en concentraciones comparables, medidas en las mismas condiciones, con los márgenes de tolerancia indicados en la Tabla 28 (Decisión de la Comisión 2002/657/CE).

Intensidad relativa (% sobre pico base)	Tolerancia permitida LC-MS/MS
> 50%	± 20%
20-50%	± 25%
10-20%	± 30%
< 10%	± 50%

Tabla 28. Relación de desviaciones consideradas según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE para la evaluación de la confirmación.

A lo largo de los años 2009-2011 se analizaron muestras de las diferentes campañas de patatas fritas, panes tostados y galletas. Los resultados obtenidos del análisis de todas las muestras (> LOQ) por LC-MS/MS se muestran en la Figura 24.

Se analizaron un total de 49 muestras de patatas fritas, 22 galletas y 26 panes tostados (de los cuales 10 estaban por debajo del LOQ). Como era de esperar, los valores más elevados correspondieron a las patatas fritas, en algunos casos pudiendo llegar a superar los 2500 $\mu\text{g/kg}$. En el caso de las galletas, los niveles de acrilamida detectados oscilaron entre 86 y 629 $\mu\text{g/kg}$ y para los panes entre 75 y 400 $\mu\text{g/kg}$. Es preciso destacar que los valores medios obtenidos entre el año 2009 y 2011 se redujeron significativamente en las muestras de patatas fritas, de alrededor 1300 $\mu\text{g/kg}$ en el 2009 a 600 $\mu\text{g/kg}$ en el 2011. Sin embargo sólo se observó un ligero descenso en el caso de las galletas (de 304 $\mu\text{g/kg}$ a 274 $\mu\text{g/kg}$) mientras que para los panes no hubo ninguna variación significativa (de 143 $\mu\text{g/kg}$ a 137 $\mu\text{g/kg}$).

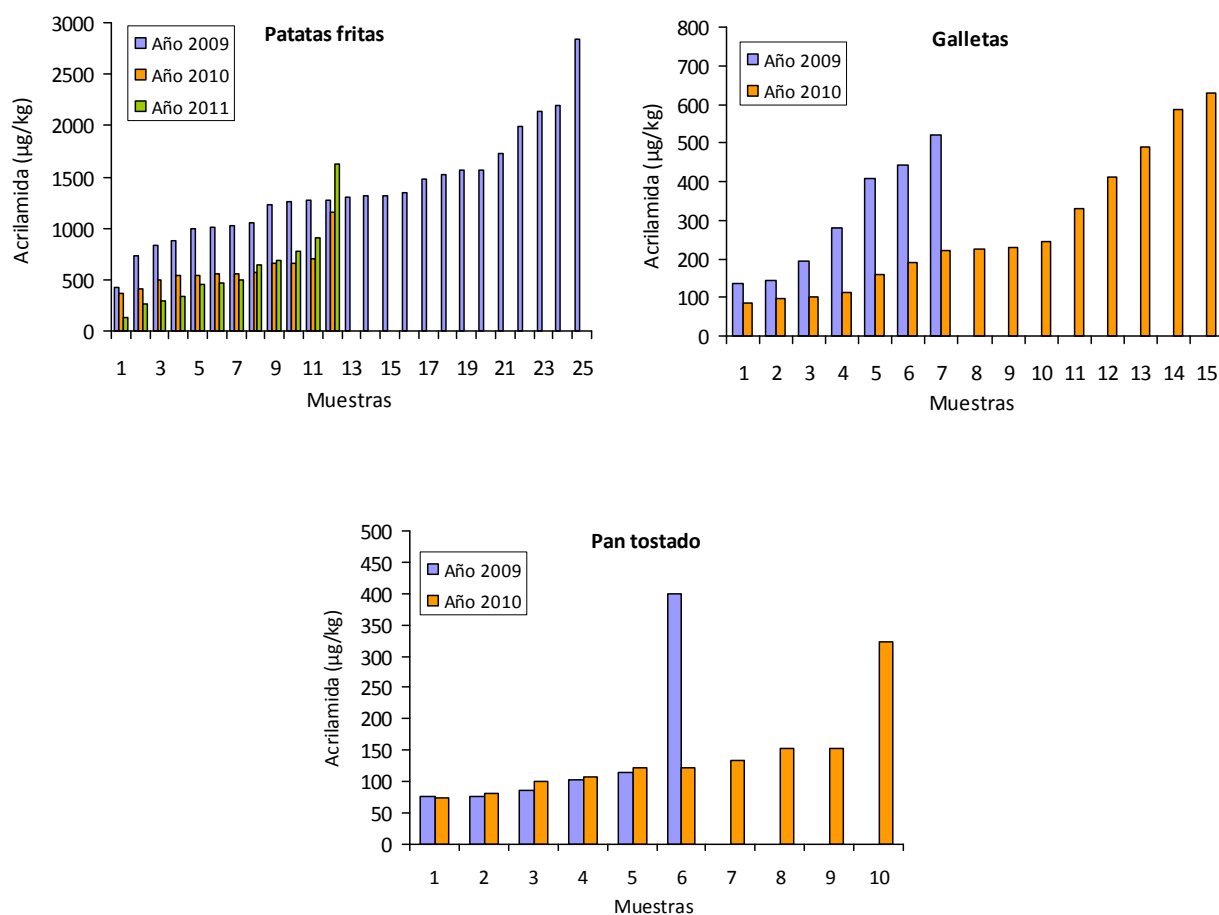


Figura 24. Valores de acrilamida en las diferentes matrices para los años 2009-2011.

5.3.7. Ensayos de aptitud

Los ensayos de aptitud constituyen una parte esencial dentro de los requisitos necesarios para la acreditación ya que permiten al laboratorio comprobar periódicamente su competencia en el análisis de un determinado analito en un tipo de matriz. La competencia de cada uno de los laboratorios se evalúa generalmente a través de su coeficiente z_i (*z-score*) que se calcula con la siguiente expresión:

$$z_i = \frac{x_i - \bar{x}}{s}$$

donde x_i es la concentración encontrada por el laboratorio participante, \bar{x} es la concentración asignada a la muestra y s es su desviación estándar.

La competencia del laboratorio se evalúa a través del valor absoluto de su *z-score*:

- Si $|z_i| < 2$: la competencia del laboratorio es satisfactoria

- Si $2 < |z_i| < 3$: la competencia del laboratorio es cuestionable
- Si $|z_i| > 3$: la competencia del laboratorio es no satisfactoria

La Tabla 29 recoge los resultados obtenidos por el LSP en los ejercicios de intercomparación para el análisis de acrilamida en las matrices validadas.

Muestra	Valor LSP (µg/kg)	Valor asignado (µg/kg)	z-score	Organismo organizador	Año
Pan tostado	271	190	1,5	FAPAS 3024	2009
Galletas	1030	1184	0,9	FAPAS 3028	2010
Galletas	260	268	0,2	FAPAS 3032	2011

Tabla 29. Resultados de la participación en ejercicios de intercomparación para acrilamida mediante LC-MS/MS.

Todos los ensayos de aptitud realizados fueron satisfactorios, observándose una mejora con el tiempo.

5.4. ACREDITACIÓN

La acreditación, de acuerdo con la norma ISO/IEC 17025, confirma la competencia técnica del laboratorio y garantiza la fiabilidad en los resultados de los ensayos y calibraciones. Aporta confianza tanto en la competencia del laboratorio para emitir resultados trazables, como en la capacidad del laboratorio para proporcionar un servicio adecuado a las necesidades de sus clientes, ya que además de requisitos de competencia técnica exige que el laboratorio disponga de un sistema de gestión de la calidad definido por la propia norma.

El LSP está acreditado por ENAC, según la norma UNE-EN ISO/IEC 17025 para la determinación de acrilamida en alimentos procesados, horneados y fritos desde octubre de 2010 (Figura 25).

PRODUCTO/MATERIAL A ENSAYAR	ENSAYO	NORMA/PROCEDIMIENTO DE ENSAYO
Moluscos bivalvos	Ácido domoico por cromatografía líquida con detector de diodos en serie (CL-DAD) ($\geq 1,25$ mg/kg)	Procedimiento interno MA-23-HPLC

UNIDAD DE TÉCNICAS INSTRUMENTALES Y CONTAMINANTES. DIVISIÓN DE ANÁLISIS DE RESIDUOS

Análisis de residuos plaguicidas mediante métodos basados en técnicas de cromatografía de gases

PRODUCTO/MATERIAL A ENSAYAR	ENSAYO	NORMA/PROCEDIMIENTO DE ENSAYO
Mieles, jaleas Productos cárnicos Productos de la pesca Leche	Cloranfenicol por cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas (CL-MS/MS) (CCα= 0,10 µg/kg)	Procedimiento interno MA-16-RP <i>Conforme a la Decisión 2002/657/CE</i>
Alimentos procesados, horneados y fritos	Acrilamida por cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (CL-MS/MS). (≥ 111 µg/kg) Patatas (≥ 70 µg/kg) Resto de alimentos	MA-17-RP
Frutas y hortalizas con alto contenido en agua y bajo contenido en grasa (LPE ¹)	Residuos de plaguicidas por cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (CG-MS-MS) Bromofos-etilo (≥0,01 mg/kg) Lindano (≥0,01 mg/kg) Bromopropilato (≥0,01 mg/kg) Mecarbam (≥0,01 mg/kg) Carbofenotrina (≥0,01 mg/kg) Metalaxilo (≥0,01 mg/kg) Cipermetrina (≥0,01 mg/kg) Metidation (≥0,01 mg/kg) Clorpirifos (≥0,01 mg/kg) Mevinfos (≥0,01 mg/kg) Clorpirifos-metilo (≥0,01 mg/kg) Mirex (≥0,01 mg/kg) Clortalonil (≥0,01 mg/kg) o,p'-DDT (≥0,01 mg/kg) Diazinon (≥0,01 mg/kg) p,p'-DDE (≥0,01 mg/kg) Diclofluanida (≥0,01 mg/kg) Paration-etilo (≥0,01 mg/kg) Diclorvos (≥0,01 mg/kg) Paration-metilo (≥0,01 mg/kg) Dicofol (≥0,01 mg/kg) Penconazol (≥0,01 mg/kg) Dieldrin (≥0,01 mg/kg) Pendimetalina (≥0,01 mg/kg) (aldrin+dieldrin) Dimetoato (≥0,01 mg/kg) Permetrin (≥0,01 mg/kg) α-Endosulfan (≥0,01 mg/kg) Pirimetanil (≥0,01 mg/kg) β-Endosulfan (≥0,01 mg/kg) Pirimicarb (≥0,01 mg/kg) Etoprofos (≥0,01 mg/kg) Pirimifos-metil (≥0,01 mg/kg) Fenarimol (≥0,01 mg/kg) Procimidona (≥0,01 mg/kg) Fention (≥0,01 mg/kg) Propizamida (≥0,01 mg/kg) Heptacloro (≥0,01 mg/kg) Tolilfluánida (≥0,01 mg/kg) Hexaclorobenceno (≥0,01 mg/kg) Triadimefon (≥0,01 mg/kg) Imazalil (≥0,01 mg/kg) Triazofos (≥0,01 mg/kg) Iprodiona (≥0,01 mg/kg) Vinclozolina (≥0,01 mg/kg) Isofenfos-Metilo (≥0,01 mg/kg)	Procedimiento interno MA-20-RP

CC α : Límite de decisión según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE (DOCE 221 de 17/08/2002)

(1) "El laboratorio dispone de una Lista Pública de Ensayo (LPE) a disposición del cliente, según se establece en el documento NT-19 de ENAC"

Figura 25. Acreditación del LSP para la determinación de acrilamida.

IV. Discusión integradora



Esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio del nuevo contaminante químico de procesado, la acrilamida, así como en su relación con otro indicador más clásico de la extensión del tratamiento térmico en alimentos, el HMF. Aunque su presencia en los alimentos se conoce desde los años 50 del siglo pasado, el HMF ha despertado de nuevo un gran interés en los últimos años, debido a su biotransformación en un derivado potencialmente tóxico, el SMF. En la actualidad, existe un debate en la comunidad científica acerca de si este éster sulfato es el responsable de la carcinogenicidad del HMF. Si esta hipótesis es cierta, entonces los humanos podrían ser más sensibles a los potenciales efectos tóxicos del HMF, debido a que las enzimas sulfotransferasas que participan en la reacción presentan mayor actividad en humanos que en roedores. Esto sugiere que los riesgos asociados a la exposición a HMF a través de los alimentos puedan ser superiores a los estimados hasta ahora en animales de laboratorio pudiendo producir efectos negativos en la salud, de ahí la necesidad de profundizar en su estudio.

La presente Memoria ofrece una visión global de la génesis, niveles y tasas de exposición de estos contaminantes en los alimentos al estudiar los diferentes parámetros que afectan a su formación en procesos industriales y culinarios, el papel que desempeñan determinados compuestos intermedios, los mecanismos de inhibición y la exposición a través de la dieta, centrándose también en alimentos característicos en la población española.

El trabajo realizado en esta Tesis engloba uno de los aspectos más destacados de la línea principal de investigación de nuestro grupo centrada en la RM: la seguridad alimentaria.

Capítulo 1. Estudios sobre la influencia de los constituyentes del alimento y las condiciones de procesado

Efecto de la composición del alimento

A lo largo de la Introducción se ha comentado que los azúcares reductores son los factores determinantes en la formación de acrilamida en alimentos ricos en almidón. Sin embargo, en los productos a base de cereales, el factor limitante es el contenido de asparagina libre (CIAA, 2011). La harina de trigo es la principal fuente de este aminoácido y su contenido depende del tipo de cereal, de la variedad así como del grado de extracción durante la molienda.

En la Figura 26 se muestran los contenidos en asparagina en diversas harinas y fracciones de la molienda. Las partes más externas del grano son generalmente las más ricas en asparagina, y por tanto, las mayores concentraciones del precursor de acrilamida se encuentran en el salvado. Las harinas refinadas, por el contrario, contienen los niveles más bajos de asparagina. La concentración del aminoácido en el salvado depende no sólo de la distribución de los aminoácidos en el grano, sino también de la eficacia en el fraccionamiento durante el proceso de molienda. La separación del salvado del endospermo es generalmente más eficaz en el trigo en comparación con otros cereales, dando así un nivel relativamente bajo del aminoácido libre en la harina refinada y un alto contenido en el salvado.

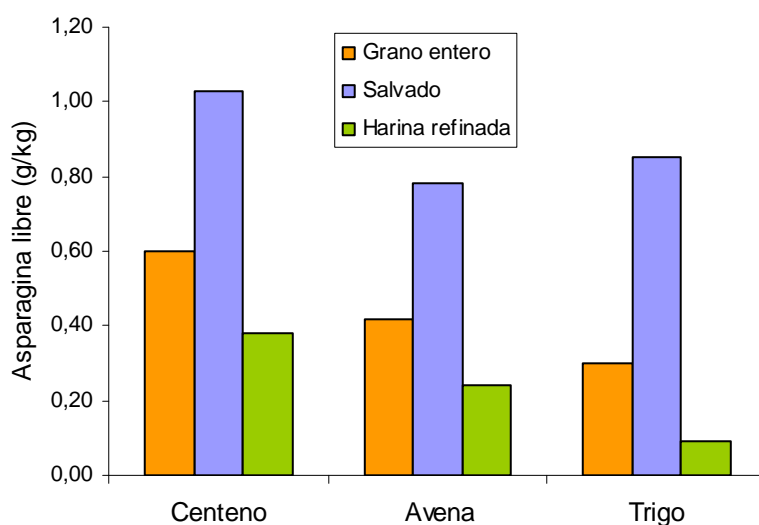


Figura 26. Contenido de asparagina libre en las diferentes fracciones de grano de harina de centeno, avena y trigo (Mustafa y col., 2011).

En el **Artículo 1.1**, se analizó el contenido de acrilamida mediante un método basado en LC-MS desarrollado previamente por nuestro grupo de investigación. Se mostró que las galletas con un aporte extra de fibra (> 5%) contenían mayores niveles de acrilamida que las no enriquecidas en fibra dietética (< 5%). Este hecho puede explicarse debido al enriquecimiento con salvado de trigo y/o harina de trigo integral lo que supone una mayor concentración de asparagina libre con respecto a la harina de trigo normal (CIAA, 2011). Las galletas enriquecidas con ingredientes funcionales también mostraron los niveles más bajos de acrilamida. Esto es debido a la incorporación en las galletas de alcoholes de azúcar, como el maltitol y lactitol así como de almidón de patata, en lugar de los azúcares simples (glucosa y fructosa) (Claus y col., 2008b).

También, se ha de destacar la importancia que tienen los agentes gasificantes del tipo bicarbonato empleados en productos de galletería como parte de la composición de estos alimentos. En nuestro trabajo, se confirmó este papel al observarse diferencias significativas en los valores de acrilamida en las galletas elaboradas con NH_4HCO_3 como único gasificante, con respecto a aquéllas que contenían mezcla de NH_4HCO_3 y NaHCO_3 . El NH_4HCO_3 potencia la formación de acrilamida al aumentar el pH del sistema, favoreciendo así la formación de la base de Schiff y acelerando de este modo la reacción (Amrein y col., 2006a). Paralelamente, también promueve la formación de los intermedios reactivos 1,2-dicarbonílicos como se discutirá posteriormente en el Capítulo 2.

En este trabajo se estudió también el contenido de acrilamida en productos de panadería. Los resultados mostraron que las diferencias significativas encontradas pudieron deberse a las diferentes condiciones de horneado aplicadas a los productos ya que sus composiciones fueron similares.

Es importante tener en cuenta los diferentes ingredientes empleados en la composición del alimento ya que el contenido final de acrilamida podría diferir sustancialmente en los productos de panadería que consumimos. Cualquier cambio producido en la composición podría comprometer las propiedades organolépticas y nutricionales de los productos. En galletas elaboradas con menor proporción de trigo integral y/o salvado se producirían menores niveles de acrilamida pero a su vez se vería reducida su calidad nutricional, de ahí que resulte imprescindible tener en cuenta el balance riesgo/beneficio en la cadena de toma de decisiones durante la evaluación del riesgo

Este artículo ha contribuido a conocer los niveles de acrilamida en productos comercializados en un sector tan importante como es el de la panadería y galletería, identificando los puntos críticos para una posterior actuación en estrategias de mitigación.

Efecto de las condiciones de procesado

El efecto de las condiciones de procesado en relación a la formación de acrilamida e HMF en un modelo de masas fritas fue estudiado en un alimento típico español: los churros (**Artículo 1.2**). Los resultados recogidos por las diferentes organizaciones internacionales en sus bases de datos, con el propósito de evaluar la exposición y riesgos de la ingesta de acrilamida, no abarcan todos los sectores representativos de la dieta. Es por ello importante considerar el

estudio de los niveles de acrilamida en productos regionales o específicos de cada Estado miembro de la UE. Además, hasta el momento de iniciar este trabajo de investigación no existían apenas datos sobre acrilamida en churros, sólo dos artículos informando de manera puntual en una única muestra (Bermudo y col., 2006; Yusa y col., 2006). Con respecto al HMF, era la primera vez que se publicaban datos en este tipo de alimentos. Posteriormente Kukurova y col., informaron de valores de estos dos contaminantes en una masa frita similar en cuanto al proceso de fritura, las rosquillas (Kukurova y col., 2009).

El propósito de este trabajo fue realizar un estudio cinético de la formación de acrilamida e HMF en un sistema de fritura de masas con el objeto de aportar criterios objetivos a la decisión del punto final del proceso. Las condiciones habitualmente empleadas en el proceso de fritura son temperaturas entre 185 y 200 °C y tiempos de calentamiento alrededor de 3-4 minutos, aunque determinar el punto final del tratamiento térmico conlleva parte de valoración subjetiva dependiendo del maestro artesano.

Las dos variables de procesado estudiadas, temperatura y tiempo, influyeron sobre la formación de acrilamida e HMF. La temperatura produjo un mayor efecto debido a que un incremento de tan solo 10 °C duplicó los niveles de acrilamida e HMF. Es por ello que pequeñas variaciones en la temperatura de fritura pueden tener grandes consecuencias en la concentración final. Sin embargo, al reducir la temperatura de fritura se genera una menor cantidad de estos contaminantes, pero a su vez, se producen efectos negativos en las características de los alimentos como son un mayor contenido de humedad o una menor intensidad de color, y en consecuencia la aceptabilidad del producto por parte del consumidor puede verse reducida. Se debe considerar el compromiso entre la reducción de acrilamida durante el tratamiento térmico y el mantenimiento de las propiedades organolépticas. Del mismo modo, condiciones de fritura más severas, es decir, por encima de los valores óptimos definidos, causarían un exceso de pérdida de humedad y por consiguiente un producto demasiado tostado que conduciría a un rápido incremento en los niveles de acrilamida e HMF. Todo esto hace que la determinación del punto final del proceso de fritura se convierta en un parámetro crítico en las condiciones de procesado.

La medida del color proporcionó resultados útiles a la hora de analizar el contenido de estos alimentos. Es preciso comentar que los resultados se obtuvieron a partir del análisis de toda la muestra y no únicamente de la superficie, a pesar de que la formación del color durante el

proceso de fritura es un fenómeno superficial, lo que origina que los valores recogidos sean algo más bajos.

Sobre la determinación de acrilamida e HMF en muestras de churros comerciales conviene señalar que el número de muestras recogidas podría ser aún bajo para poder considerarlas como representativas a nivel nacional, especialmente teniendo en cuenta que este tipo de productos está disponible en pequeños puestos ambulantes, en bares y churrerías pudiendo haber grandes variaciones dependiendo de la ciudad o región en relación a las prácticas de fritura o a la morfología del producto. De ahí que si se comparan los resultados obtenidos de acrilamida ($< \text{LOQ}-72 \mu\text{g/kg}$) con los publicados en el año 2008 en 4 muestras de churros por el grupo de investigación de Bermudo y col. ($134-430 \mu\text{g/kg}$) (Bermudo y col., 2008) se observen diferencias significativas.

Efecto del aceite

En el **Artículo 1.3** se ha evaluado la influencia del aceite desde dos aspectos: compuestos fenólicos y grado de oxidación. En un estudio previo, nuestro grupo de investigación en colaboración con otros investigadores demostraron la relación entre la concentración de compuestos orto-difenólicos del aceite de oliva virgen de fritura y la formación de acrilamida en patatas fritas de aperitivo (Napolitano y col., 2008). Previamente, estos compuestos fenólicos demostraron también ser efectivos en mitigar la formación de aminas heterocíclicas (Monti y col., 2001). Además, hoy en día son escasos los estudios sobre la influencia de compuestos antioxidantes presentes en el aceite de oliva y la formación de acrilamida e HMF. Basándonos en estos antecedentes, se desarrolló este trabajo con el propósito de investigar el efecto de la composición fenólica del aceite de oliva en la formación de acrilamida e HMF en galletas elaboradas a escala de laboratorio, donde el aceite forma parte del propio alimento.

La determinación espectrofotométrica del contenido total de compuestos fenólicos del aceite, siguiendo el método de Folin-Ciocalteu, y la caracterización individual de los mismos mediante LC-MS fue realizada por el grupo de investigación del Profesor V. Fogliano (Nápoles, Italia). Los secoiridoides en forma de agliconas y en las formas dialdehídicas de la oleuropeina y el ligstrosido, unidos a un grupo carboximetílico así como el lignano pinoresinol fueron los principales compuestos fenólicos hallados.

Las galletas elaboradas con el aceite de oliva de mayor concentración de compuestos fenólicos mostraron niveles de acrilamida significativamente más bajos después de un tiempo de horneado prolongado. Se encontró que la reducción estaba vinculada a una correlación inversa entre el contenido total de compuestos fenólicos y los niveles de acrilamida, y en particular, para los compuestos que presentan en su estructura grupos orto-difenólicos. El aceite con mayor cantidad de polifenoles es el que presentó la más alta concentración de derivados de oleuropeína (compuestos dihidroxilfenoles) y por tanto el más efectivo. Sin embargo, no se observó efecto alguno sobre los valores de acrilamida para otros tiempos de calentamiento. Tampoco se encontró ninguna variación debida a los diferentes aceites en la formación de HMF a ninguno de los tiempos estudiados.

En cuanto a la capacidad antioxidante, sorprendentemente, no se correlacionó con los niveles de polifenoles totales después del tratamiento térmico. Resultados similares fueron publicados por Kotsiou y col. (Kotsiou y col., 2010), probablemente debido a que estos compuestos fenólicos suprimen la RM y con ello los PRM con capacidad antioxidante.

El mecanismo por el cual ocurre la reducción en los niveles de acrilamida podría explicarse debido a que los compuestos fenólicos, gracias a su polaridad intermedia, pueden situarse en la interfase entre la fracción lipídica y el medio hidrofílico y minimizar el avance de las reacciones donde participan compuestos carbonílicos derivados de los lípidos y/o bloquear los radicales provenientes de la degradación de los azúcares. En ambos casos, el resultado es la reducción de los reactantes intermediarios necesarios para la formación de acrilamida.

Esta hipótesis está en concordancia con los resultados que posteriormente se han publicado sobre la capacidad de otros compuestos fenólicos, como por ejemplo el ácido ferúlico o la epigallocatequina-3-galato para inhibir la formación de acrilamida a través de los compuestos carbonílicos del aceite (Ou y col., 2010) o la capacidad de la catequina de limitar la degradación mediada por radicales de azúcares a través de la RM y/o caramelización (Capuano y col., 2010). Además, se ha descrito que el efecto del hidroxitirosol para contrarrestar la toxicidad de la acrilamida en células Caco-2 (Rodríguez-Ramiro y col., 2011) y en células de hepatoma humano HepG2 (Zhang y col., 2009) se debe a su capacidad para neutralizar los radicales libres.

Sin embargo, otros estudios han descrito que la adición de compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen sobre una emulsión o sobre patatas frescas puede suprimir tanto la formación de acrilamida como favorecerla. Este hecho es debido a que en la estructura de los derivados de

la oleuropeína y del tirosol existen tanto un grupo fenol, que actúa como donante de hidrógeno en la interacción quinina-amina entre los fenoles y la 3-aminopropionamida bloqueando la vía de producción de acrilamida, como grupos aldehídos que promueven la formación de acrilamida (Kotsiou y col., 2010; Kotsiou y col., 2011). Cabe señalar que son necesarios más estudios para profundizar en el tema, ya que los mecanismos por los que se produce esta reducción no están del todo establecidos, y los resultados también dependerán de la cantidad y del tipo de compuestos fenólicos así como de las condiciones empleadas.

Otro de los aspectos importantes derivados de este artículo se ha basado en evaluar la influencia del aceite termoxidado, como parte de la composición de las galletas, en la formación de acrilamida.

Cuando los lípidos se oxidan forman hidroperóxidos, los cuales son susceptibles de una posterior oxidación o descomposición en productos secundarios, tales como aldehídos, cetonas, epóxidos, ácidos y alcoholes. Aunque la química de producción térmica de los lípidos y los hidratos de carbono son muy diferentes, tanto los productos procedentes de la oxidación lipídica como de la RM engloban compuestos carbonílicos, por lo que no es sorprendente que algunos productos de oxidación de los lípidos puedan favorecer la formación de acrilamida (Yuan y col., 2008a). Zamora e Hidalgo (Zamora e Hidalgo, 2008) demostraron en sistemas modelo que algunos lípidos oxidados pueden degradar la asparagina a acrilamida, así como favorecer la degradación de la asparagina a 3-aminopropionamida (Hidalgo y col., 2010a). No obstante, apenas hay estudios acerca de la influencia del aceite oxidado sobre la formación de acrilamida en alimentos y se refieren principalmente a las patatas fritas (Mestdagh y col., 2007). También se han utilizado emulsiones con acrilamida para estudiar el efecto del aceite oxidado (Hedegaard y col., 2008).

Los datos del presente artículo confirman que los lípidos oxidados podrían promover la formación de acrilamida aumentando los niveles en casi un 60% al igual que los de HMF, aunque el efecto de la oxidación del aceite solo se hizo evidente a tiempos prolongados de calentamiento. Respecto a este hecho, es preciso señalar que los compuestos carbonílicos de la oxidación lipídica se forman no sólo durante la termoxidación previa del aceite sino que se favorecen también durante el tratamiento térmico. Además, un alto contenido de humedad en las muestras podría retrasar el efecto del aceite oxidado (Capuano y col., 2010). Estos resultados discrepan de los aportados por otros autores que afirman que la oxidación del

aceite no ejerce una influencia significativa en la formación de acrilamida (Mestdagh y col., 2008b; Mestdagh y col., 2007; Hedegaard y col., 2008).

Estos resultados parecen sugerir que los compuestos carbonílicos podrían desempeñar un papel importante en la formación de los contaminantes de procesado estudiados en esta Tesis. Por consiguiente, resulta necesario desarrollar una metodología analítica para poder detectarlos y cuantificarlos, tal y como se discute en el siguiente capítulo.

Capítulo 2. Desarrollo de un método analítico para la determinación de glioxal y metilglioxal en galletas. Estudios sobre la influencia de compuestos dicarbonílicos en la formación de acrilamida e hidroximetilfurfural

Los compuestos 1,2-dicarbonílicos se forman en los alimentos tanto por reacción de los grupos amino de las proteínas con azúcares reductores (Reacción de Maillard) como por la degradación de los azúcares durante la caramelización y por oxidación de los lípidos, aparte de por procesos enzimáticos en productos fermentados.

Los compuestos 1,2-dicarbonílicos más estudiados son el glioxal y el metilglioxal. Se encuentran en una gran cantidad de alimentos entre los que destacan la miel, el vino, la cerveza, el café, los aceites o el pan. Sin embargo, hasta el momento de realizar este trabajo no se había descrito su presencia en galletas.

En la bibliografía se describen diversos métodos analíticos para la determinación de los compuestos dicarbonílicos en matrices muy diversas, incluida la biológica. El metilglioxal se ha cuantificado por espectrometría de masas después de una derivatización química con 2,4-dinitrofenilhidrazina o 4-amino-5-hidrazino-3-mercaptop-1,2,4-triazol. Asimismo, se han analizado por GC, previa derivatización con cisteamina para generar derivados de 2-acetil-tiazolidina. Las quinoxalinas resultantes fueron detectadas por HPLC con detector de fluorescencia, UV o MS, así como por GC con detector ECD o MS. Sin embargo, el método más ampliamente utilizado y específico implica la derivatización de las sustancias con derivados del 1,2-diaminobenceno como el OPD seguida de cuantificación de las resultantes quinoxalinas por GC o HPLC.

Este trabajo (**Artículo 2.1**) optimiza y valida internamente un método analítico para la cuantificación de los compuestos dicarbonílicos glicoxal y metilglicoxal en productos de galletería. La detección de estos aldehídos es importante debido a que reaccionan irreversiblemente con los grupos amino de las proteínas, los nucleótidos y con los lípidos, formando AGEs y productos avanzados de lipoxidación (ALEs), implicados en el envejecimiento y en el desarrollo de diversas patologías asociadas a la diabetes.

Siguiendo un trabajo publicado por De Revel y col. en 2000 (De Revel y col., 2000), y realizando las pertinentes modificaciones en la metodología para adaptarlo a las matrices de estudio, se llevó a cabo el proceso de derivatización. Finalmente se obtuvo la separación cromatográfica adecuada de los compuestos con buena resolución en tan sólo 9 minutos. Estos resultados presentaron una mejora considerable respecto a los obtenidos en vinos por De Revel y col. (De Revel y col., 2000), y otros autores (Daglia y col., 2007), aunque fue necesario aumentar el tiempo del cromatograma a 20 min para permitir la elución de otros picos que pudiesen interferir en sucesivas inyecciones.

El método desarrollado se aplicó a muestras de galletas comerciales encontrándose cantidades de glicoxal y metilglicoxal diez veces superiores a las obtenidas para productos de panadería como el pan o el pan tostado (Roiter y col., 1972; Nagao y col., 1986). Este hecho se debe fundamentalmente a las diferentes composiciones de ambos productos. En general, la composición de las galletas es más compleja y contiene ingredientes como azúcares reductores y probablemente aceites insaturados, los cuales son precursores de los compuestos dicarbonílicos a través de la RM, caramelización u oxidación lipídica. En comparación, los derivados del pan se componen de harina de trigo, levadura, sal y agua, por lo que es de esperar que los compuestos dicarbonílicos se encuentren en menores proporciones en condiciones similares de procesado.

Los valores más altos de metilglicoxal fueron hallados en galletas que contenían entre sus ingredientes bicarbonato amónico y fructosa, ya que ambos productos favorecen su generación (Amrein y col., 2006a). El NH_3 es un nucleófilo y reacciona con los grupos carbonilos de la glucosa o la fructosa formando iminas, las cuales permiten la generación de glucosonas que por reacción retro-aldólica conducen a la formación de fragmentos reactivos como el metilglicoxal.

El glioxal, por el contrario, no se forma a partir de la 1- y 3-glucosona sino por reacciones retro-aldólicas de la glucosa (Thornalley y col., 1984). La explicación de las concentraciones más altas de metilglioxal a partir de fructosa en comparación con glucosa, se encuentra en la capacidad para formar directamente tanto el 1- como la 3-glucosona vía 2,3-enodiol o 2,3-enaminol, por lo que aumentan las posibles rutas para formarlo.

Cabe señalar también que la formación de ambos compuestos se ve favorecida por el proceso de horneado. Además, las concentraciones más elevadas fueron encontradas en la superficie y en los bordes de la galleta, debido a que en esas zonas la temperatura y la evaporación de agua fue mayor, favoreciéndose de ese modo la RM y la caramelización.

Adicionalmente, se inició la evaluación del papel de los intermedios 1,2-dicarbonílicos en la formación de acrilamida e HMF. Hasta la fecha, diversos estudios han mostrado el papel de estos compuestos en la formación de acrilamida a través de la ruta de degradación de Strecker (Amrein y col., 2006b; Mottram y col., 2002). Yuan y col. (Yuan y col., 2008 a,b) encontraron que casi el 80% de acrilamida se forma a través de la participación de los compuestos 1,2-dicarbonílicos en sistemas modelo de Maillard así como otros autores han señalado la importancia del glioxal y metilglioxal en la formación de acrilamida (Amrein y col., 2006a; Koutsidis y col., 2008). Sin embargo, hasta la fecha de publicación del artículo, no existía ningún estudio previo en alimentos.

Para realizar este trabajo se emplearon galletas comerciales y horneadas en el laboratorio. Se observó una correlación entre la cantidad de acrilamida y los compuestos 1,2-dicarbonílicos generados durante el horneado de las galletas en el laboratorio. La formación de estos compuestos tiene lugar durante las primeras etapas del tratamiento térmico hasta que se observa generación de acrilamida (Yuan y col., 2008a). Mientras que en el caso del HMF, aunque se encontró también una correlación significativa, esta reveló que su formación fue altamente dependiente de la temperatura, en contraste con los dicarbonílicos, que se forman en las etapas previas de la reacción.

Con respecto a las galletas comerciales, siete muestras mostraron valores de metilglioxal y acrilamida muy altos en comparación con el resto. Esta diferencia podría ser debida no sólo a las variaciones producidas por el proceso de horneado del alimento sino fundamentalmente a su composición. Sorprendentemente, esos niveles tan elevados correspondieron a galletas

.....

elaboradas con bicarbonato amónico o fructosa en lugar de bicarbonato sódico y glucosa. Amrein y col. (Amrein y col., 2006a) demostraron, en sistemas modelo, que el bicarbonato amónico, en comparación con el sódico, promueve la formación de compuestos dicarbonílicos siendo el efecto más acusado en presencia de fructosa en el caso del metilglioxal. Por lo tanto, es importante resaltar que este hallazgo demostró por primera vez que la formación de acrilamida está relacionada con el intermedio reactivo metilglioxal en muestras comerciales de galletas. Un año más tarde Ye y col. (Ye y col., 2011) encontraron también una correlación significativa entre el metilglioxal y la acrilamida en patatas fritas preparadas a escala de laboratorio.

Este trabajo subraya la relevancia de los intermedios 1,2-dicarbonílicos como precursores de la formación de acrilamida e HMF. También aporta nueva información sobre la dinámica de estos compuestos tóxicos en alimentos y abre una vía para el desarrollo de nuevas estrategias de mitigación.

Capítulo 3. Estudios de inhibición

Desde el descubrimiento de la acrilamida en los alimentos se han realizado multitud de investigaciones con el propósito de minimizar su formación. Es por ello que dicho objetivo se haya planteado en el presente capítulo.

En los tres artículos que engloban este capítulo se ha evaluado el papel que desempeña la piridoxamina como inhibidora de la formación de acrilamida. En 1988, Khatami y col. (Khatami y col., 1988) mostraron los primeros resultados que evidenciaban que los vitámeros B₆ inhibían la glicación proteica siendo la piridoxamina la que mejores propiedades inhibidoras mostraba (Voziyan, 2005). Numerosos trabajos han revelado, además, su gran capacidad para inhibir la formación de AGEs *in vivo* y de ALEs (Voziyan y col., 2002; Onorato y col., 2000). La piridoxamina exhibe una excelente capacidad farmacológica contra el desarrollo de las patologías asociadas a la diabetes, mediante la inhibición de la RM y la reducción de la actividad de compuestos carbonílicos (Reddy y col., 2006). Por otro lado, existe un estudio previo que demuestra que suplementos de vitamina B₆ pueden retrasar y reducir la severidad de la neurotoxicidad causada por acrilamida (Loeb y col., 1981). Estos resultados realizados en

el campo médico nos indujeron a pensar que podría actuar como un inhibidor de la formación de acrilamida en los alimentos.

En primer lugar (**Artículo 3.1**) se estudió el efecto de la vitamina B₆ y sus vitámeros en la formación de acrilamida. Con este fin se emplearon sistemas modelo (Glu-Asn) simulando la RM producida en un alimento de baja humedad. Los resultados mostraron que la piridoxamina es capaz de reducir las etapas de formación/eliminación de acrilamida en las condiciones estudiadas siendo la inhibición más efectiva a elevadas temperaturas, donde se obtuvo el 51% de reducción, lo cual es prometedor para su posterior aplicación durante el horneado. Además, la concentración de acrilamida disminuyó de manera dosis-dependiente y en concordancia con los resultados publicados simultáneamente por otros autores, la piridoxamina, la piridoxina y la vitamina C fueron las que produjeron los mayores porcentajes de reducción y en menor medida el piridoxal (Zeng y col., 2009).

De especial interés fueron las diferencias encontradas entre los porcentajes de inhibición en relación con las tres formas de la vitamina B₆. Estos resultados parecen indicar que los grupos funcionales de la cadena lateral en la posición cuatro del anillo de piridina podrían desempeñar un papel significativo.

En la bibliografía se indica que el piridoxal inhibe la glicación proteica mediante la formación de una base de Schiff protectora a través de su grupo aldehído con los restos amino de la proteína (Khatami y col., 1988). En el caso de la piridoxamina, debido a su grupo amino nucleófilo, es capaz de reaccionar con los compuestos carbonílicos de bajo peso molecular (glioxal, metilglioxal, glicolaldehído o 3-deoxiglucosonas provenientes de la RM, de la auto-oxidación de la glucosa o de la peroxidación lipídica) formar aductos y desactivar, por tanto, las siguientes etapas de la reacción de glicación que conducirían a la formación de AGEs y ALEs (Voziyan y col., 2002; Nagaraj y col., 2002).

Los datos obtenidos confirman que la piridoxamina no actúa en el primer paso de la RM ya que no ejerce una influencia significativa en la descomposición de la Glu y Asn. El mecanismo por el cual la piridoxamina inhibe a la acrilamida parece estar relacionado con el bloqueo de los intermedios 1,2-dicarbonílicos glioxal y metilglioxal, que como ha sido demostrado en el Artículo 2.1 juegan un papel importante en su formación. Posteriormente, Cheng y col. (Cheng y col., 2009) confirmaron nuestros resultados pero utilizando un flavonoide cítrico, la naringenina. Más recientemente, se ha publicado que la taurina en presencia de glucosa y

asparagina podría inhibir la formación de acrilamida por el atrapamiento de intermedios carbonílicos (Hao y col., 2011).

Otro factor a resaltar fue el descenso significativo en el pardeamiento de las muestras adicionadas con piridoxamina, confirmando la hipótesis de su capacidad para atrapar los precursores formados durante la degradación de los azúcares en la RM que más adelante están implicados en la formación de compuestos coloreados.

Además, en este trabajo se propone que el efecto inhibitor de la piridoxamina se produce por el bloqueo de la ruta de formación de acrilamida a través de la 3-aminopropionamida. Se observó un aumento en las concentraciones relativas de la 3-aminopropionamida en las muestras adicionadas con piridoxamina. De hecho, se ha demostrado que esta amida se convierte en acrilamida con mayor eficacia en presencia de compuestos dicarbonílicos independientemente del grado de humedad (Perez-Locas y col., 2008b; Zamora y col., 2009). Es por ello que, la piridoxamina podría reaccionar con estos compuestos y competir con la 3-aminopropionamida por los grupos carbonilos disponibles en la formación de acrilamida.

En el **Artículo 3.2** se continuó con la investigación y se analizó el glioxal y el metilglioxal en los sistemas de Maillard. A temperaturas superiores a 120 °C, las concentraciones de estos compuestos disminuyen en presencia de piridoxamina. Voziyan y col. (Voziyan y col., 2002) demostraron que la piridoxamina es capaz de reaccionar con el glioxal formando aductos. El mecanismo de acción, descrito en la bibliografía, se inicia mediante un ataque nucleófilo de la amina de la piridoxamina sobre uno de los grupos carbonilo del glioxal formando una base de Schiff, la cual cicla formando un aducto hemiaminal por una reacción intramolecular a través del grupo hidroxilo del anillo de la piridoxamina. Este intermedio monomérico condensa con otro intermedio análogo y da lugar al aducto final. Asimismo, Nagaraj y col. (Nagaraj y col., 2002) describieron que la piridoxamina inhibe la formación de AGEs a través de la formación del aducto metilglioxal-piridoxamina.

Conviene señalar que en el artículo anterior se observó una reducción en los valores de acrilamida por efecto de la piridoxamina a todos los tiempos de reacción estudiados. Sin embargo, tras analizar los resultados obtenidos de este trabajo se comprobó que no se produjo disminución en las concentraciones de los compuestos dicarbonílicos hasta un tiempo más avanzado, que sorprendentemente coincidió con el tiempo a partir del cual empezó la etapa de eliminación de la acrilamida. En conclusión, la piridoxamina parece inhibir la

acrilamida a través de los compuestos 1,2-dicarbonílicos sólo en las etapas finales. Este hecho nos indujo a buscar un nuevo mecanismo de acción.

El **Artículo 3.3** continuó la investigación orientada hacia la constatación de la hipótesis de una reacción directa entre la piridoxamina y la acrilamida.

Los resultados muestran que la desaparición de la acrilamida fue más relevante en presencia de la piridoxamina. La piridoxamina es capaz de reaccionar directamente con la acrilamida, luego era lógico pensar que se estaban formando aductos de reacción. Los aductos fueron identificados mediante HPLC-DAD y HPLC-fluorescencia, detectándose en total cuatro significativos: AA-PM-1, AA-PM-2, AA-PM-3 y AA-PM-4. A medida que transcurría la reacción algunos picos cromatográficos iban desapareciendo (AA-PM-3 y AA-PM-4) mientras que simultáneamente otros iban aumentando (AA-PM-1 y AA-PM-2) lo que da una idea de la complejidad del sistema de reacción.

La mayor dificultad técnica se encontró en el aislamiento y la purificación de los aductos. Se utilizaron dos métodos de cromatografía semipreparativa, cromatografía en columna flash seguido de cromatografía en capa fina, y posteriormente HPLC con columna semipreparativa. Fueron necesarias además dos composiciones diferentes de fase móvil para lograr aislar cada uno de los aductos. La primera con ácido trifluoracético proporcionó la separación de los aductos 2 y 4, y con la segunda fase móvil con ácido heptafluorbutírico se consiguió la separación de los aductos 1 y 3. Las investigaciones posteriores se centraron en la elucidación estructural de los compuestos 1 y 3 al ser los más representativos cuantitativamente.

La estructura del aducto 1 contiene una unidad de piridoxamina unida a dos moléculas de acrilamida (aducto dímero), mientras que la del aducto 3 únicamente lleva una molécula de acrilamida (aducto monómero). Se llegó a la conclusión que el aducto 3 era un compuesto intermedio de reacción debido a que desaparecía conforme avanzaba la reacción, al contrario de lo que ocurría con el aducto 1. Por consiguiente, la hipótesis de reacción englobó dos adiciones consecutivas de Michael (Figura 27); primeramente se produjo la adición nucleófila del grupo amino de la piridoxamina al carbono β de la acrilamida (sitio electrófilo) para dar el aducto 3, el cual sigue reaccionando con otra molécula de acrilamida para formar el aducto 1 debido al exceso de acrilamida en la mezcla de reacción.

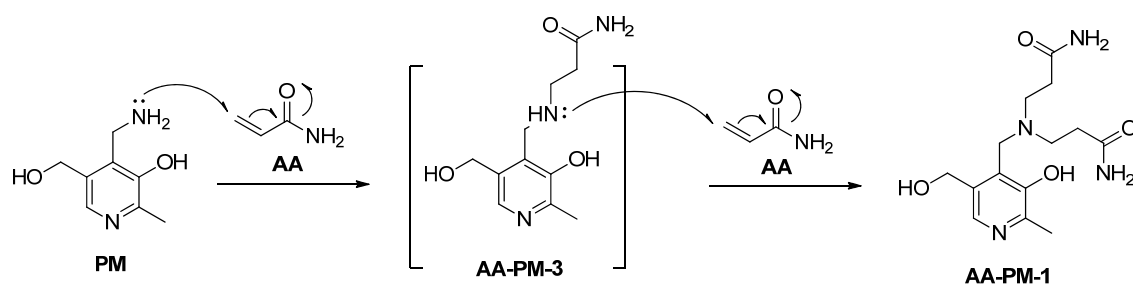


Figura 27. Reacción de adición entre piridoxamina y acrilamida para dar los correspondientes aductos de Michael. PM: Piridoxamina. AA: Acrilamida. AA-PM-3: Aducto 3. AA-PM-1: Aducto 1.

Con respecto a la formación de aductos de acrilamida como método de inhibición, diversos artículos han identificado aductos de Michael con aminoácidos (Koutsidis y col., 2009; Adams y col., 2010) con mercaptanos (Hidalgo y col., 2010b) y con taurina (Hao y col., 2011). Sin embargo, son escasos los trabajos donde se haya estudiado el mecanismo de acción y donde se hayan caracterizado los aductos (Chen y col., 2009; Zeng y col., 2010).

Por otro lado, y con objeto de evaluar la aplicación directa del efecto de la vitamina, se prepararon y hornearon galletas con exceso de piridoxamina a dos concentraciones diferentes. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la capacidad inhibidora de la piridoxamina respecto a la formación de acrilamida, mediada por la formación del aducto 3. Parece claro que no se formó el aducto 1, mayoritario en los sistemas modelos, ya que en las galletas el exceso de nucleófilo provocó un cambio en el mecanismo de reacción.

Los estudios llevados a cabo en estos tres trabajos muestran que el efecto inhibidor de la piridoxamina ocurre no sólo porque puede competir con la asparagina por los compuestos 1,2-dicarbonílicos sino también por la reacción directa con la acrilamida para formar monómeros y dímeros aductos (Figura 28).

Estas investigaciones han proporcionado información valiosa para el diseño de nuevas alternativas dirigidas a reducir o prevenir la formación de acrilamida mediante la reacción con intermedios clave en su formación y/o por la presencia de compuestos con grupos nucleófilos.

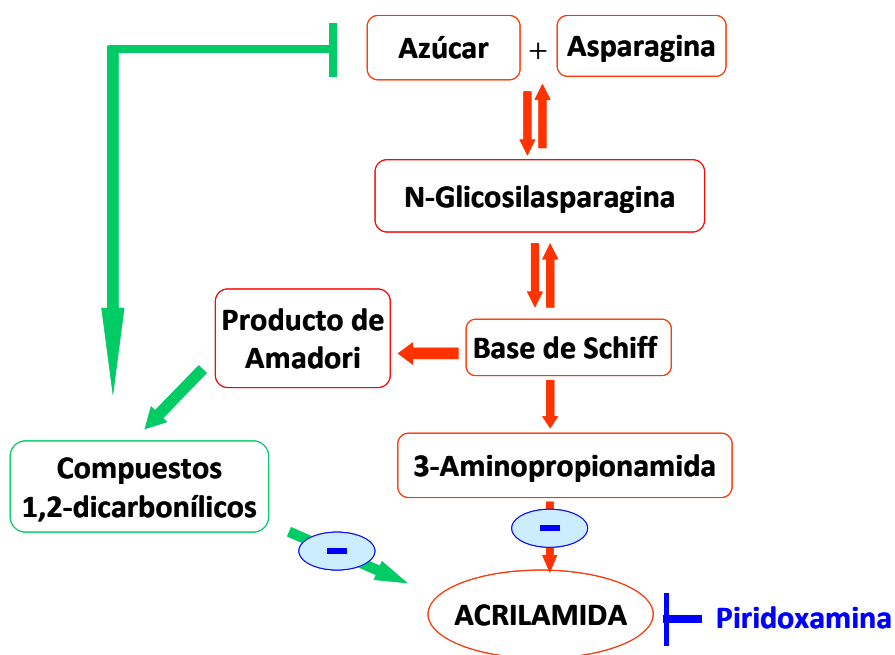


Figura 28. Posibles mecanismos de inhibición de acrilamida por efecto de la piridoxamina.

Capítulo 4. Estudios de estimación de ingesta

Tras ampliar el conocimiento de la formación en acrilamida en alimentos y su relación con el marcador de procesado HMF, se decidió obtener una estimación de la ingesta diaria de ambos compuestos en la dieta española. Ésta es esencial para la evaluación del riesgo ya que permite conocer la relación entre los efectos adversos observados en los humanos y la exposición a estas sustancias.

Estimación de ingesta de acrilamida a partir de las patatas fritas de aperitivo

En muchos países, especialmente en Europa, se han publicado numerosos trabajos acerca de la exposición a acrilamida a través de la dieta. Sin embargo, hasta el momento de publicar el **Artículo 4.1** no existían estudios específicos que refirieran su ingesta en España. Dada la relevancia que tienen los productos a base de patata, en este trabajo se intenta avanzar un paso más en la obtención de una estimación de la ingesta diaria de acrilamida en la dieta española a partir de las patatas fritas (aperitivo).

Los valores de acrilamida encontrados (ver Parte Experimental) descendieron en aproximadamente un 50% con respecto al muestreo realizado en el 2004 por nuestro grupo de investigación. A pesar de que existe evidencia científica de la reducción en los niveles de acrilamida desde el año de su descubrimiento hasta nuestros días, aún continúan los esfuerzos para lograr valores “tan bajos como sean razonablemente posibles” (principio ALARA) ya que no existe una legislación que fije unos límites máximos permitidos. En este sentido, la Oficina Federal Alemana de Protección al Consumidor y Seguridad Alimentaria, declaró un valor señal recomendado de 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en el año 2006 para el caso de las patatas fritas. La mayoría de las patatas del presente estudio (86%) presentaron niveles de acrilamida inferiores a dicho valor. Posteriormente, la Comisión Europea ha adoptado también el valor indicativo de 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acrilamida para las patatas fritas de aperitivo (European Comimission, 2011).

En cuanto a la ingesta promedio de acrilamida, la primera estimación calculada a partir del modelo determinístico no evalúa la probabilidad o incertidumbre o incluso no identifica los consumidores de alto riesgo, ya que se basa en la población y no en los sujetos. No obstante, es una primera aproximación y una herramienta de evaluación a fin de diseñar un estudio más específico en el caso de riesgo potencial. Además, se ha descrito que la contribución de los alimentos de forma individual a la exposición total se puede identificar mejor con este modelo (Petersen y col., 2005). Sin embargo, estimaciones más realistas de baja y alta exposición se obtendrían mediante el uso de modelos probabilísticos (modelos Monte Carlo).

En las evaluaciones de la exposición de los consumidores también es importante saber si existen diferencias significativas entre los diferentes subgrupos de la población. La base de datos de consumo nacional identifica cinco subgrupos: Comunidades Autónomas, tamaño de la población, nivel socioeconómico, número de miembros en la familia y estado de vida. Se ha demostrado que existen grandes diferencias en función de las diferentes categorías estudiadas, hasta aproximadamente un 50% del valor de la exposición estimada para el total de la población.

Los datos de la segunda estimación mostraron que la exposición para los niños fue 2,6 veces la de los adultos, lo que era previsible debido no sólo por una combinación de menor peso corporal y una mayor demanda calórica, sino también por un mayor consumo. Esta relación está en línea con la recopilada por estudios posteriores (EFSA, 2011, FAO/WHO, 2010).

Cuando se comparan (Tabla 30) los niveles de ingesta de patatas fritas de aperitivo en los adultos de la población española con los aportados por la EFSA (EFSA, 2011), se observa que la ingesta estimada estuvo cerca de los valores más altos de Europa, donde el rango de consumo varió desde 0,006 $\mu\text{g/kg}$ peso corporal/día en Francia e Italia hasta 0,069 $\mu\text{g/kg}$ peso corporal/día en Letonia. La estimación es superior a los valores presentados para el caso de España. Por el contrario, en el caso de los niños, el valor estimado está en concordancia con los datos de España y de nuevo cerca de los valores más altos de la UE (Holanda o Grecia).

Los valores de ingesta demuestran que España es uno de los países más expuestos a acrilamida en relación a las patatas fritas de aperitivo, siendo los niños un grupo de riesgo. Sin embargo, no son muchos los estudios realizados en nuestro país respecto a la ingesta de acrilamida a través de las patatas fritas u otros alimentos, y los que hay, fueron realizados por nuestro grupo de investigación o en colaboración con otros autores (Rufián-Henares y col., 2006b; Delgado y col., 2010; Delgado y col., 2012). Son necesarios por tanto, un mayor número de estudios para la determinación de las concentraciones de acrilamida tanto en los alimentos habituales (patatas fritas, galletas, pan, etc.) como en alimentos específicos (rosquillas, churros, etc.) o en dietas para aumentar el conocimiento sobre el potencial efecto sobre la salud causado por la exposición a la acrilamida a través de la dieta.

País	Año	Ingesta total ($\mu\text{g/kg/día}$)	Patatas fritas (%)	Contribución parcial ($\mu\text{g/kg/día}$)
ADULTOS				
Bélgica	2004-2005	0,38	9,4	0,036
República Checa	2003-2004	0,75	5,1	0,038
Alemania	2005-2007	0,33	5,3	0,017
Dinamarca	2000-2002	0,78	2,9	0,023
Finlandia	2007	0,51	2,4	0,012
Francia	2005-2007	0,41	1,6	0,006
Reino Unido	2000-2001	0,63	8,5	0,054
Hungría	2003	0,77	1,0	0,008
Irlanda	1997-1999	0,56	6,9	0,039
Italia	2005-2006	0,56	1,0	0,006
Letonia	2008	0,44	5,6	0,024
Holanda	2005-2006	0,52	13,4	0,069
Suecia	1997-1998	0,49	5,3	0,026
España	1999-	0,44	4,6	0,020
España	2009	0,56	5,8	0,032
Arribas-lorenzo y col., 2009	2008			0,053

País	Año	Ingesta total (µg/kg/día)	Patatas fritas (%)	Contribución parcial (µg/kg/día)
NIÑOS				
Bélgica	2002-2003	2,00	3,2	0,064
Bulgaria	2007	1,69	0,6	0,010
República Checa	2003-2004	1,80	3,9	0,070
Alemania	2006-2008	1,13	11,5	0,130
Alemania	2006-2008	1,17	11,5	0,135
Alemania	2006-2008	1,17	10,2	0,119
Dinamarca	2000-2002	1,42	5,5	0,078
Finlandia	2003-2006	1,42	3,3	0,047
Finlandia	2000	0,86	6,2	0,053
Francia	2005-2007	1,41	3,9	0,055
Grecia	2004-2005	1,36	10,9	0,148
Italia	2005-2006	1,25	2,9	0,036
Letonia	2008	0,99	10,7	0,106
Holanda	2003	1,02	15,7	0,160
Suecia	2003	1,08	8,2	0,089
España	1998-2000	1,34	10,3	0,138
España	1998-2000	0,89	16,5	0,147
Arribas Lorenzo y col., 2009	2008			0,142

Tabla 30. Contribución de las patatas fritas de aperitivo a la exposición a acrilamida en la dieta de diferentes países. Adultos 18-64 años. Niños: 7-12 años (EFSA, 2011).

Por último, hay que destacar que existen varios factores que pueden complicar la precisión en la estimación de la exposición. Los niveles de acrilamida en los alimentos disponibles en el mercado varían en gran medida entre las distintas marcas y lotes de producción. Además, podría afectar también la duración y las condiciones de conservación, así como las condiciones en que los alimentos son preparados y procesados y los diferentes hábitos alimenticios. Otro de los factores que explica las diferencias entre estimaciones son los diferentes métodos utilizados para calcular la exposición (FFQ, encuesta recordatorio 24 h de consumo de alimentos, registro de consumo, etc.) así como los diferentes enfoques estadísticos. Por tanto, no siempre es posible una comparación directa entre estimaciones. Por ello, es preciso resaltar que existe cierta reserva acerca de la fiabilidad absoluta de las evaluaciones realizadas. Es probable que los datos de consumo contribuyan más a las incertidumbres que los propios métodos analíticos, ya que estos últimos, son evaluados por medio de materiales de referencia (Kim y col., 2010).

Estimación de ingesta de HMF y sustancias relacionadas a partir del café

En un estudio de estimación de ingesta en la población noruega, el café ha sido identificado como la fuente más importante de HMF (63%), tanto por los altos niveles encontrados como por su elevado consumo (Husøy y col., 2008). De ahí que sea relevante obtener una imagen de la situación actual en otros países de la UE con diferentes hábitos de consumo, como es el caso de nuestro país. En este sentido, Rufián-Henares y col. (Rufián-Henares y col., 2008) publicaron meses antes a nuestro trabajo una evaluación de la ingesta de HMF en la dieta española e informaron de que el café contribuye aproximadamente el 50%, cálculo estimado a partir de bases de datos de consumo total. Sin embargo, la información de dicho trabajo podría ser incompleta ya que los datos de HMF para el café molido fueron extrapolados a partir de estudios realizados en Austria, donde el tipo de café consumido es diferente al no estar presente el café torrefacto, muy característico de España, ya que supone hasta el 2% del consumo. Además hay que tener en cuenta que en España el café mezcla, natural más torrefacto, representa alrededor del 45% del consumo total del café. Desde que se ha demostrado la contribución significativa de este alimento a la ingesta diaria de HMF, resulta necesario obtener una visión más cercana a la realidad sobre su presencia y las fuentes de variabilidad. Por tanto, el objetivo del **Artículo 4.2** fue contribuir a una mejor comprensión de las fuentes y niveles de consumo de HMF a partir del café en la población española, teniendo en cuenta la aportación del café molido y soluble.

Los resultados del trabajo mostraron que los niveles de HMF en el café soluble fueron mayores que los del café molido. Comportamientos similares fueron observados también por otros autores (Teixidó y col., 2011; Husøy y col., 2008). Los valores medios encontrados para HMF, HMFA y FA en las muestras de café molido fueron similares, alrededor de 600 mg/kg. Aunque para el caso del HMF, hubo mayor rango de variación entre el valor mínimo y máximo, debido al tipo y a las condiciones de procesado aplicadas. Con respecto al café soluble, los niveles de HMFA y FA fueron entre 3-4 veces menor que en el café molido, probablemente, como consecuencia de la pérdida producida durante el proceso de evaporación y secado.

El estudio de los tres tipos de café (natural, torrefacto y mezcla) reveló que el café torrefacto es el que tiene mayor concentración de HMF seguido del de mezcla y por último el natural. Es conocido que al café torrefacto se le añade azúcar (hasta 15 g sacarosa/100 g de café verde) antes del proceso del tueste con el fin de intensificar la RM.

Otros artículos de la bibliografía han descrito cantidades comprendidas entre 26 y 120 mg/kg en cafés naturales y entre 500 y 2300 mg/kg en los torrefactos (Kanjahn y col., 1996). Más recientemente, se han encontrado valores medios de 346 y 113 mg/kg para el café mezcla y natural, respectivamente, mediante análisis por cromatografía electrocinética capilar (Teixidó y col., 2011).

Por el contrario, no se ha encontrado ninguna diferencia apreciable en los valores de HMFA y FA para los diferentes tipos de café e incluso ninguna correlación significativa ($P < 0,05$) entre estos compuestos y el HMF. Este hecho probablemente se deba a que la formación del HMFA y FA esté teniendo lugar a través de otras reacciones distintas a la ruta de formación del HMF. Se ha descrito que el HMFA se forma también a partir de gliceraldehído y piruvato, precursores diferentes a los del HMF (Murkovic y col., 2007).

La ingesta media de café (soluble más molido) fue de 9,59 mg/día por persona. Sin embargo, el estudio de estimación llevado a cabo por Rufián-Henares y col. (Rufián-Henares y col., 2008) mostró un valor de 4,9 mg/día. Esta diferencia puede explicarse debido a que la contribución de café soluble y café torrefacto no fue considerada, de ahí que el valor estimado sea significativamente menor, teniendo en cuenta que, como se describió anteriormente, los niveles de HMF en café torrefacto y soluble son significativamente mayores en comparación con el natural y el café molido mezcla.

Debido a la enorme variabilidad encontrada en los niveles de HMF en el café, fue necesario estimar el consumo en relación al tipo de tostado del café ya que la estimación de la contribución a la ingesta de HMF puede verse muy afectada, aproximándonos de este modo a un escenario más realista. El valor obtenido fue entonces de 5,26 mg/día, que es casi la mitad del cálculo anterior. De este valor total de HMF, 0,05 mg/día correspondieron al café torrefacto, 0,38 mg/día al natural, 3,02 mg/día al mezcla, y 1,82 mg/día al soluble.

La UE ha recomendado un valor de consumo diario teórico de HMF Y FA, en base al criterio mTAMDI (*modified Theoretical Added Maximum Daily Intake*), de 1600 y 1300 µg/persona/día, respectivamente (EFSA, 2005a). Previamente, la EFSA estableció un valor de ingesta diaria admisible (IDA) de 0,5 mg/kg de peso corporal para el furfural, sin embargo no ha sido establecido así para el HMF. En nuestro trabajo de investigación se obtuvo un valor promedio de exposición a HMF a partir del café de 75,15 µg/kg de peso corporal/día.

Por último, sería conveniente disponer de un mayor volumen de datos sobre la exposición al HMF a través de la ingesta, así como promover estudios bien definidos y desarrollar estrategias preventivas que reduzcan su exposición ya que los datos existentes, especialmente a partir del café, son escasos.

Capítulo 5. Puesta a punto, validación y acreditación (norma UNE EN ISO/IEC 17025) de un método analítico para la determinación de acrilamida en alimentos

En un mercado cada vez más global y más exigente con el cumplimiento de unos estándares de calidad, la confianza en los productos y servicios pasa por la confianza que la sociedad tenga en los agentes evaluadores de la conformidad, en los laboratorios. Por tanto, cada vez es más evidente la necesidad de garantizar la calidad de las determinaciones analíticas con el fin de asegurar que los datos de concentración informados sean fiables.

La credibilidad de los resultados obtenidos está más relacionada con la utilización de sistemas de gestión que permitan asegurar una monitorización del control de calidad sobre el trabajo desarrollado en todo el proceso, desde la recepción de las muestras hasta la elaboración del informe final.

La Acreditación es la herramienta establecida a escala internacional para generar esa confianza necesaria. Aún así, la falta de normativa internacional y de legislación comunitaria específica así como la ausencia de un método de análisis oficial para el control de los niveles de acrilamida en alimentos, podría suponer una limitación en la interpretación de los resultados obtenidos. Por ello, resulta necesario, disponer de un método normalizado de análisis para la comparación de los valores objeto de estudio que procedan de diversos laboratorios. En este sentido, el Comité Europeo de Normalización (CEN) dispone como fecha límite el 31 de diciembre de 2013 para definir el método para la determinación de acrilamida en alimentos a base de patatas, de cereales y café mediante LC-ESI-MS/MS (European Commission, 2010).

Una parte importante de esta memoria se ha dedicado a realizar el proceso de validación del análisis de acrilamida en alimentos (pan, galletas y patatas fritas). Los resultados obtenidos han permitido demostrar la fiabilidad del procedimiento analítico, asegurar la calidad de los ensayos realizados y acreditar al LSP por ENAC según la norma europea UNE EN ISO 17025.

VI. Conclusiones

Las principales conclusiones que se pueden derivar de los distintos capítulos de la presente Memoria se resumen a continuación:

Capítulo 1. Estudios sobre la influencia de los constituyentes del alimento y las condiciones de procesado

- La formación de acrilamida en los productos de galletería está íntimamente ligada a la composición del alimento, en cuanto a los niveles de azúcares reductores, agentes gasificantes, fibra y nivel de oxidación de la fracción lipídica. En concreto:
 - Las galletas con mayor proporción de fibra presentan los niveles más elevados de acrilamida debido a un aumento en el contenido proteico neto.
 - La utilización de bicarbonato amónico como agente gasificante favorece el incremento en las tasas de formación de acrilamida en las mismas condiciones de horneado.
 - Los productos de oxidación lipídica deben ser considerados como un factor importante en la formación de acrilamida durante el horneado.
 - Los niveles de acrilamida se reducen hasta un 20% en las galletas elaboradas con aceite de oliva virgen con elevada proporción de dihidroxi/monohidroxi secoiridoides.
- El establecimiento de un punto final preciso durante la elaboración de masas fritas es crítico para minimizar la formación de acrilamida e hidroximetilfurfural, donde un aumento de tan solo 10 °C en la temperatura del aceite de fritura duplicaría los niveles de estos contaminantes.

Capítulo 2. Desarrollo de un método analítico para la determinación de glioxal y metilglioxal en galletas. Estudios sobre la influencia de compuestos dicarbonílicos en la formación de acrilamida e hidroximetilfurfural

- Una vez optimizado y validado el método analítico para la determinación de glioxal y metilglioxal en galletas por HPLC-UV, se ha constatado que, bajo condiciones controladas de horneado, la formación de los compuestos dicarbonílicos está directamente relacionada con la duración del proceso y con la formación de acrilamida e hidroximetilfurfural en el producto.

Capítulo 3. Estudios de inhibición

- La piridoxamina es un inhibidor eficaz de la acrilamida en las condiciones experimentales estudiadas. El mecanismo de inhibición contempla dos vías dependiendo del estadio en que se encuentre la reacción de formación de acrilamida:
 - En las etapas iniciales tiene lugar una reacción de adición de Michael a través de un ataque nucleofílico del grupo amino de la piridoxamina sobre el carbono β de la acrilamida para formar posteriormente aductos entre ambos compuestos.
 - En las etapas finales tiene lugar un mecanismo de acción indirecto y mediado por la reacción entre la piridoxamina y los compuestos dicarbonílicos reactivos glicoxal y metilglicoxal, precursores en la formación de la acrilamida.

Capítulo 4. Estudios de estimación de ingesta

- La contribución del consumo de patatas fritas de aperitivo a la ingesta diaria de acrilamida en la dieta española, se estima en 0,042 y 0,053 $\mu\text{g/kg}$ peso corporal/día, calculada mediante un modelo determinístico y un registro de encuesta de consumo estimado de 3 días, respectivamente.
- La exposición dietética a hidroximetilfurfural a partir del café en la población española se estima en 8,57 mg HMF/día de manera global. Sin embargo, tomando en cuenta la contribución específica de cada tipo de tostado de café, el valor estimado es de 5,26 mg HMF/día.

Capítulo 5. Puesta a punto, validación y acreditación (norma UNE EN ISO/IEC 17025) de un método analítico para la determinación de acrilamida en alimentos

- Se ha realizado la puesta a punto, validación y acreditación según norma UNE EN ISO/IEC 17025 de un procedimiento analítico para la determinación de acrilamida en alimentos mediante LC-MS/MS en colaboración con el LSP. Dicho procedimiento es aplicable a alimentos procesados, horneados y fritos.

VII. Anexos

Anexo I. Ejercicios de intercomparación

La metodología empleada, en los artículos publicados, para la determinación de acrilamida por LC-MS fue validada mediante la participación en 4 ejercicios de intercomparación. Los resultados obtenidos (Tabla 31) fueron satisfactorios según el criterio estadístico aplicado (*z-score*), lo que incrementa la confianza en esta técnica analítica. Por tanto, se puede considerar el método de LC-MS utilizado en la presente Tesis, como una clara alternativa de bajo coste al LC-MS/MS para la determinación de acrilamida en alimentos.

Muestra	Valor laboratorio ($\mu\text{g/kg}$)	Valor asignado ($\mu\text{g/kg}$)	z-score	Organismo organizador	Año
Patatas fritas (aperitivo)	312	344	0,5	IRMM 23273	2008
Pan tostado	205	271	1,2	FAPAS 3024	2009
Galletas	253	322	1,1	FAPAS 3025	2010
Pan tostado	143	166	0,6	FAPAS 3030	2011

Tabla 31. Resultados de los ejercicios de intercomparación de acrilamida en los que ha participado nuestro laboratorio.

Anexo II. Publicaciones relacionadas

La investigación de la presente Memoria ha permitido, en colaboración con el grupo de investigación del Profesor Vural Gökmen de la Universidad de Hacettepe (Ankara, Turquía), la publicación de una serie de artículos científicos en revistas SCI. Asimismo, esta Tesis ha dado lugar a un capítulo en un libro así como a diversos trabajos de divulgación.

Trabajos de divulgación:

- Alarcón, E.; Borge, J.; Martín-Gutiérrez, M. J.; Arribas-Lorenzo, G.; Morales, F.J. Determinación de acrilamida en alimentos procesados. *Alimentaria*, **2007**, 383, 109-110.
- Jiménez-Pérez, S.; Morales, F. J.; Arribas-Lorenzo, G.; Martí, E. Formación de acrilamida durante el procesado y cocinado de los alimentos. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias*, **2007**, 15, 195-225.
- Morales, F. J.; Arribas-Lorenzo, G.; Jiménez-Pérez, S.; Jiménez-Navarro, P.; Alarcón-Serrano, E.; Borge-Larrañaga, J.; Martín-Gutiérrez, M. J. Actuaciones sobre la presencia de acrilamida en alimentos comercializados en España. *Alimentaria*, **2008**, 8, 102-109.
- Jiménez-Pérez, S.; Morales, F. J.; Arribas-Lorenzo, G.; Martí-López, E. Formación de acrilamida durante el cocinado y procesado de alimentos. Ministerio de Medio Ambiente y Rural y Marítimo. **2008**, 195-227, Capítulo. ISBN-113527595.
- Arribas-Lorenzo, G.; Morales, F. J. Quantitation of acrylamide in potato chips by HPLC-MS. *Food Industry Hi-Tech*. **2010**, 3, 21-24.



.....

Arribas-Lorenzo, G; Morales F. J. Recent insights in acrylamide as carcinogen in foodstuffs In *Advances in Molecular Toxicology*; Fishbein, J. C.; Heilman, J. M., Eds.; Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, **2012**; 6, pp 163-193. ISBN: 978-0-444-59389-4

.....

Abstract

Acrylamide is a heat-induced contaminant naturally formed during home cooking and industrial processing of many foods consumed daily around the world. French fries, potato crisps, bread, cookies, and coffee exert the highest contribution to dietary exposure of acrylamide to humans. Furthermore, food safety international bodies and industrial sectors are very active for implementing strategies to minimize its formation during roasting, baking, frying, toasting, etc. Given the prevalence of acrylamide in the human diet and its toxicological effects, it is a general public health concern to determine the risk of dietary intake of acrylamide. However, associations between dietary acrylamide exposure and increase risk of different cancers are somewhat controversial and do not have a direct extrapolation to the global population. Accordingly, further long-term studies with a general view are ongoing to clarify the risk scenario and to improve the methodology to detect small increases in cancer incidence.

.....



Gökmen, V.; Açar, Ö. Ç.; Arribas-Lorenzo, G.; Morales, F. J. Investigating the correlation between acrylamide content and browning ratio of model cookies. *J. Food Eng.* **2008**, 87, 380-385.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.12.029>

Abstract

A computer vision based image analysis algorithm was developed for the prediction of acrylamide level in cookies. Digital images of cookies were segmented based on the predefined color references representing the mean red, green and blue values of brownish and cream-colored regions. The browning ratio was defined as the ratio of brown pixels to total pixels and calculated using the segmented images of cookies. Cookies were prepared from four recipes by baking at 200 and 220 °C for different times up to 25 min. The rates of browning and acrylamide formation followed almost the same kinetic pattern during baking. Recipe formulation and baking conditions affected these rates in a similar way. A significant correlation ($r = 0.946$, $p < 0.01$) was observed between the browning ratio and acrylamide concentration in cookies. A browning ratio of less than 8% indicated that acrylamide concentration is below its detection limits determined by liquid chromatography–mass spectrometry. The success of the algorithm was 100% on sorting cookies based on a threshold level of 150 ng/g acrylamide.



Morales, F. J.; Martin, S.; Açar, Ö. Ç.; Arribas-Lorenzo, G.; Gökmen, V. Antioxidant activity of cookies and its relationship with heat-processing contaminants: a risk/benefit approach. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, 228, 345-354.

DOI: 10.1007/s00217-008-0940-9

Abstract

Formation of both health promoting and potential harmful substances (acrylamide and hydroxymethylfurfural) has been associated to the extent of the Maillard reaction. The effects of recipe compositions in terms of leavening agent (ammonium and sodium bicarbonates) and sugars (sucrose and glucose), and baking conditions (temperature and time) on the antioxidant activity (AOA) in cookies were studied. The cookies were baked at different temperatures (180–220 °C) for different times (10–25 min). AOA was measured by the ferric reducing power (FRAP), 2,20-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,2,-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) coloured radicals, and oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) in automated plate-reader assays. Net AOA varied regarding the assay applied, whereas higher AOA was always obtained for the ABTS assay and lower for DPPH assay, and ranging from 2 to 200 µmol Trolox/g sample. At higher temperature and baking times, higher AOA in cookies regardless of the formulation was recorded. Glucose enhances formation of compounds with higher AOA compounds as compared with sucrose recipes. Ammonium bicarbonate clearly promotes the formation of AOA for sucrose recipes but this effect is not observed in glucose recipes and varied with the AOA procedure applied. A risk/benefit index, based on the concomitant formation of neo-formed contaminants and substances with AOA (potentially health-promoting substances) is presented, and its application for recipe comparison is discussed. Risk/benefit index rapidly increased with increased temperature and time of baking.



Gökmen, V.; Morales, F. J.; Ataç, B.; Serpen, A.; Arribas-Lorenzo, G.
Multiple-stage extraction strategy for the determination of acrylamide
in foods. *J. Food Comp. Anal.* **2009**, 22, 142-147.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2008.09.007>

Abstract

The effects of single- and multiple-stage extraction procedures were studied on the extraction yield of acrylamide for various cereal- and potato-based thermally processed foods. In the multiple-stage procedure, extraction of ground sample was sequentially performed up to four times using 10 mM formic acid or methanol as the extraction solvents. The extraction yield of acrylamide was determined for each stage. Single-stage extraction resulted in lower acrylamide concentrations for all food matrices regardless of the type of extraction solvent, solvent-to-sample ratio, prior defatting, extraction temperature and time. The results revealed that a single-stage procedure underestimated the concentration of acrylamide in foods by a factor of up to 50% depending on the type of solvent applied during the extraction. The extractability was an exponential function which can be used to optimize the multiple extraction conditions during the analysis of foods for acrylamide. In general, the aqueous extraction using 10 mM formic acid was found to be more effective than the methanol extraction, and required lesser number of extraction steps for a complete extraction of acrylamide from food.

VIII. Bibliografía

Acrylamide Infonet operated by the Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition (JIFSAN); <http://www.acrylamide-food.org>.

Adams, A.; Hamdani, S.; Van Lancker, F.; Mejri, S.; de Kimpe, N. Stability of acrylamide in model systems and its reactivity with selected nucleophiles. *Food Res. Intern.* **2010**, *43*, 1517-1522.

Ahmed, H. H.; Elmegeed, G. A.; El-Sayed, E. S. M.; Abd-Elhalim, M. M.; Shousha, W. G.; Shafic, R. W. Potent neuroprotective role of novel melatonin derivatives for management of central neuropathy induced by acrylamide in rats. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5452-5459.

Ait-Ameur, L. A.; Trystam, G.; Birlouez-Aragon, I. Accumulation of 5-HMF in cookies during the baking process: validation of an extraction method. *Food Chem.* **2006**, *98*, 790-796.

Ames, J. M. The Maillard reaction. In *Biochemistry of Food Proteins*; Hudson, B. J. F., Eds.; Elsevier Applied Science: London and New York, **1992**; pp 150-154.

Ameur, L. A.; Trystram, G.; Birlouez-Aragon, I. Accumulation of 5-hydroxymethyl-2-furfural in cookies during the backing process: validation of an extraction method. *Food Chem.* **2006**, *98*, 790-796.

Amrein, T. M.; Schonbachler, B.; Rohner, F.; Lukac, H.; Schneider, H.; Keiser, A.; Escher, F.; Amado, R. Potential for acrylamide formation in potatoes: data from the 2003 harvest. *Eur. Food Res. Technol.* **2004a**, *219*, 572-578.

Amrein, M.; Schonbachler, B.; Escher, F.; Amado, R. Acrylamide in gingerbread: Critical factors for formation and possible ways for reduction. *J. Agric. Food Chem.* **2004b**, *52*, 4282-4288.

Amrein, T. M.; Andres, L.; Manzardo, G. G. G.; Amadò, R. Investigations on the promoting effect of ammonium hydrogencarbonate on the formation of acrylamide in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2006a**, *54*, 10253-10261.

Amrein, T. M.; Escher, F.; Amadò, R. Controlling acrylamide formation during baking. In *Acrylamide and other hazardous compounds in heat-treated foods*; Skog, K., Alexander, J., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, U.K., **2006b**; pp 459-477.

Andrzejewski, D.; Roach, J. A. G.; Gay, M. L.; Musser, S. M. Analysis of coffee for the presence of acrylamide by LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1996-2002.

Anese, M.; Quarta, B.; Frias, J. Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits. *Food Chem.* **2011**, *126*, 435-440.

Anese, M.; Suman, M.; Nicoli, M. C. Acrylamide removal from heated foods. *Food Chem.* **2010**, *119*, 791-794.

Arribas-Lorenzo, G.; Fogliano, V.; Morales, F. J. Acrylamide formation in a cookie system as influenced by the oil phenol profile and degree of oxidation. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *229*, 63-72.

Arribas-Lorenzo, G.; Morales, F. J. Effect of pyridoxamine on acrylamide formation in a glucose/asparagine model system. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 901-909.

Arribas-Lorenzo, G.; Pintado-Sierra, M.; Morales, F. J. Isolation and structural characterization of acrylamide-pyridoxamine adducts. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 321-328.

Bakhiya, N.; Monien, B.; Frank, H.; Seidel, A.; Glatt, G. Renal organic anion transporters OAT1 and OAT3 mediate the cellular accumulation of 5-sulfooxymethylfurfural, a reactive, nephrotoxic metabolite of the Maillard product 5-hydroxymethylfurfural. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 414-419.

Barros, A.; Rodrigues, J. A.; Almeida, P. J.; Oliva-Teles, M. T. Determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in selected beer and wine, by HPLC with UV spectrophotometric detection, after derivatization with o-phenyldiamine. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **1999**, *22*, 2061-2069.

Baum, M.; Böhm, N.; Görlitz, J.; Lantz, I.; Merz, K. H.; Ternité, R.; Eisenbrand, G. Fate of ¹⁴C-acrylamide in roasted and ground coffee during storage. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 600-608.

Becalski, A.; Lau, B. P. Y.; Lewis, D.; Seaman, S. W. Acrylamide in foods: occurrence, sources and modelling. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 802-808.

Becalski, A.; Lau, B. P. Y.; Lewis, D.; Seaman, S. W. Acrylamide in French fries: influence of free amino acids and sugars. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3801-3806.

Becalski, A.; Seaman, S. Furan precursors in food: A model study and development of a simple headspace method for determination of furan. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 102-106.

Bermudo, E.; Moyano, E.; Puignou, L.; Galceran, M. T. Determination of acrylamide in foodstuffs by liquid chromatography ion-trap tandem mass-spectrometry using an improved clean-up procedure. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *559*, 207-214.

Bermudo, E.; Moyano, E.; Puignou, L.; Galceran, M. T. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of acrylamide in typical Spanish products. *Talanta* **2008**, *76*, 389-394.

Bermudo, E.; Ruiz-Calero, V.; Puignou, L.; Galceran, M. T. Microemulsion electrokinetic chromatography for the analysis of acrylamide in food. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3257-3262.

Biedermann, M.; Biedermann-Brem, S.; Noti, A.; Grob, K.; Egli, P.; Mändli, H. Two GC-MS methods for the analysis of acrylamide in foods. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **2002a**, *93*, 638-652.

Biedermann, M.; Biedermann-Brem, S.; Noti, A.; Grob, K. Methods for determining the potential of acrylamide formation and its elimination in raw materials for food preparation, such as potatoes. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **2002b**, *93*, 653-667.

Biedermann, M.; Noti, A.; Biedermann-Bremm, S.; Noti, A.; Grob, K.; Egli, P.; Mandli, H. Experiments on acrylamide formation and possibilities to decrease the potential of acrylamide formation in potatoes. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **2002c**, *93*, 668-687.

Blanco-Gomis, D.; Gutiérrez-Alvarez, M. D.; Sopena-Naredo, L.; Mangas-Alonso, J. J. High-performance liquid chromatographic determination of furfural and hydroxymethylfurfural in apple juices and concentrates. *Chromatogr.* **1991**, *32*, 45-48.

Borouhaki, M. T.; Nikkiah, E.; Kazemi, A.; Oskoei, M.; Raters, M. Determination of acrylamide level in popular Iranian brands of potato and corn products. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 2581-2584.

BVL, **2002**. German Federal Office of Consumer Protection and Food Safety.
http://www.bvl.bund.de/EN/01_Food/04_Acrylamid_en/00_Minimierungskonzept_en/lm_acrylamid_minimierungskonzept_en_node.html

- Calbiani, F.; Careri, N.; Elviri, L.; Mangia, A.; Zagnoni, I. Development and single-laboratory validation of a reversed-phase liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method for identification and determination of acrylamide in foods. *J. AOAC Int.* **2004**, *87*, 107-115.
- Capuano, E.; Oliviero, T.; Açar, Ö. Ç.; Gökmen, V.; Fogliano, V. Lipid oxidation promotes acrylamide formation in fat-rich model systems. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1021-1026.
- Capuano, E.; Fogliano, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 793-810.
- Casado, F. J.; Sánchez, A. H.; Montañó, A. Reduction of acrylamide content of ripe olives by selected additives. *Food Chem.* **2010**, *119*, 161-166.
- Casella, I. G.; Pierri, M.; Contursi, M. Determination of acrylamide and acrylic acid by isocratic liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1107*, 198-203.
- Castle, L. Determination of acrylamide monomer in mushrooms grown on polyacrylamide gel. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1261-1263.
- Castle, L.; Eriksson, S. Analytical methods used to measure acrylamide concentrations in foods. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 274-284.
- Cerny, C. The aroma side of the Maillard reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2008**, *1126*, 66-71.
- Cheng, K. W.; Zeng, X.; Tang, Y. S.; Wu, J. J.; Liu, Z.; Sze, K. H.; Chu, I. K.; Chen, F.; Wang, M. Inhibitory mechanism of naringenin against carcinogenic acrylamide formation and nonenzymatic browning in Maillard model reactions. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1483-1489.
- CIAA, **2006**. The CIAA acrylamide "toolbox," rev. 9.
- CIAA, **2011**. Food Drink Europe Acrylamide Toolbox; http://www.fooddrinkurope.eu/uploads/publications_documents/Toolboxfinal260911.pdf
- Ciesarova, Z.; Suhaj, M.; Horvathova, J. Correlation between acrylamide contents and antioxidant capacities of spice extracts in a model potato matrix. *J. Food Nut. Res.* **2008**, *47*, 1-5.
- Claus, A.; Mongili, M.; Weisz, G.; Schieber, A.; Carle, R. Impact of formulation and technological factors on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls. *J. Cereal Sci.* **2008**, *7*, 546-554.
- Claus, A.; Weisz, G. M.; Schieber, A.; Carle, R. Pyrolytic acrylamide formation from purified wheat gluten and gluten-supplemented wheat bread rolls. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006a**, *50*, 87-93.
- Claus, A.; Schreiter, P.; Weber, A.; Graeff, S.; Hermann, W.; Claupein, W.; Schieber, A.; Carle, R. Influence of agronomic factors and extraction rate on the acrylamide contents in yeast-leavened breads. *J. Agric. Food Chem.* **2006b**, *54*, 8968-8976.
- Claus, A.; Weisz, G. M.; Kammerer, D. R.; Carle, R.; Schieber, A. A method for the determination of acrylamide in bakery products using ion trap LC-ESI-MS/MS. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 918-925.
- CAC/RCP 67-**2009**. Código de prácticas para reducir el contenido de acrilamida en los alimentos; http://www.codexalimentarius.net/download/standards/11258/CXP_067s.pdf

Comisión Europea. Decisión de la Comisión de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. 2002/657/CE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, **2002**, L221/8.

Comisión Europea. Directiva 98/83/EC del Consejo de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, **1998**, L330/32.

Comisión Europea. Directiva 2002/72/CE de la Comisión de 6 de agosto de 2002, relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, **2002**, L220/18.

Comisión Europea. Recomendación de la Comisión 2 de junio de 2010 relativa al control de los niveles de acrilamida en los alimentos, 2010/307/UE. Diario Oficial de la Unión Europea, **2010**, L137/4.

Comisión Europea. Recomendación de la Comisión de 3 de mayo de 2007 relativa al control de los niveles de acrilamida en los alimentos, 2007/331/CE. Diario Oficial de la Unión Europea, **2007**, L123/33.

Consonni, R.; Gatti, A. ^1H NMR studies on Italian balsamic and traditional balsamic vinegars. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3446-3450.

Curtis, T. Y.; Muttucumaru, N.; Shewry, P. R.; Parry, M. A. J.; Powers, S. J.; Elmore, J. S.; Mottram, D. S.; Hook, S.; Halford, N. G. Effects of genotype and environment on free amino acid levels in wheat grain: implications for acrylamide formation during processing. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1013-1021.

Daglia, M.; Cuzzoni, M. T.; Dacarro, C. Antibacterial activity of coffee. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2270-2272.

Daglia, M.; Papetti, A.; Aceti, C.; Sordelli, B.; Spini, V.; Gazzani, G. Isolation and determination of α -dicarbonyl compounds by RP-HPLC-DAD in green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8877-8882.

Dattatreya, A.; Rankin, S. A. Moderately acidic pH potentiates browning of sweet whey powder. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 822-828.

Davies, R.; Hedebrant, U.; Athanassiadis, I.; Rydberg, P.; Törnqvist, M. Improved method to measure aldehyde adducts to N-terminal valine in hemoglobin using 5-hydroxymethylfurfural and 2,5-furandialdehyde as model compounds. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 1950-1957.

De la Iglesia, F.; Lazaro, F.; Puchades, R.; Maquieira, A. Automatic determination of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) by a flow injection method. *Food Chem.* **1997**, *60*, 245-250.

De Revel, G.; Pripis-Nicolau, L.; Berbe, J. C.; Bertrand, A. The detection of α -dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 102-108.

De Vleeschouwer, K.; Van der Plancken, I.; Loey, A. V.; Hendrickx, M. E. Modelling acrylamide changes in foods: from single response empirical to multiresponse mechanistic approaches. *Trends Food Sci. Technol.* **2009a**, *20*, 155-167.

- De Vleeschouwer, K.; Van der Plancken, I.; Loey, A. V.; Hendrickx, M. E. Role of precursors on the kinetics of acrylamide formation and elimination under low moisture conditions using a multiresponse approach-Part I: Effect of the type of sugar. *Food Chem.* **2009b**, *114*, 116-126.
- De Vleeschouwer, K.; Van der Plancken, I.; Loey A. V.; Hendrickx, M. E. Impact of pH on the kinetics of acrylamide formation/elimination reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7847-7855.
- De Vleeschouwer, K.; Van der Plancken, I.; Van Loey, A.; Hendrickx, M. E. Kinetics of acrylamide formation/elimination reactions as affected by water activity. *Biotechnol. Progr.* **2007**, *23*, 722-728.
- De Wilde, T.; De Meulenaer, B.; Mestdagh, F.; Govaert, Y.; Vandeburie, S.; Ooghe, W.; Fraselle, S.; Demeulemeester, K.; Van Peteghem, C.; Calus, A.; Degroodt, J.; Verhe, R. Influence of fertilization on acrylamide formation during frying of potatoes harvested in 2003. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 404-408.
- Delatour, T.; Perisset, A.; Goldmann, T.; Riediker, S.; Stadler, R. H. Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrixes such as chocolate powder, cocoa, and coffee by liquid chromatography tandem mass spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4625-4631.
- Delgado-Andrade, C.; Mesías, M.; Morales, F. J.; Seiquer, I.; Navarro, M. P. Assessment of acrylamide intake of Spain boys aged 11-14 years consuming a traditional and balanced diet. *LWT – Food Sci. Technol.* **2012**, *46*, 16-22.
- Delgado-Andrade, C.; Morales, F. J.; Seiquer, I.; Navarro, M. P. Maillard reaction products profile and intake from Spanish typical dishes. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1304-1311.
- Delgado-Andrade, C.; Seiquer, I.; Navarro, M. P. Effects of consumption of Maillard reaction. Products on magnesium digestibility and tissue distribution in rats. *Food Sci. Technol. Int.* **2007a**, *13*, 109-116.
- Delgado-Andrade, C.; Seiquer, I.; Navarro, M. P.; Morales, F. J. Maillard reaction indicators in diets usually consumed by adolescent population. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007b**, *51*, 341-351.
- Delgado-Andrade, C.; Seiquer, I.; Navarro, M. P.; Morales, F. J. Estimation of hydroxymethylfurfural availability in breakfast cereals. Studies in Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 1600-1607.
- Dinsmore, H. I.; Nagy, S. Colorimetric furfural measurement as an index of deterioration in stored citrus juices. *J. Food Sci.* **1972**, *37*, 768-770.
- Doerge, D. R.; da Costa, G. G.; McDaniel, L. P.; Churchwell, M. I.; Twaddle, N. C.; Beland, F. A. DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats. *Mutat. Res.* **2005**, *580*, 131-141.
- Doroshenko, O.; Fuhr, U.; Kunz, D.; Frank, D.; Kinzig, M.; Jetter, A.; Reith, Y.; Lazar, A.; Taubert, D.; Kirchheiner, J.; Baum, M.; Eisenbrand, G.; Berger, F. I.; Bertow, D.; Berkessel, A.; Sörgel, F.; Schömig, E.; Tomalik-Scharte, D. In vivo role of cytochrome P450 2E1 and glutathione- S-transferase activity for acrylamide toxicokinetics in humans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2009**, *18*, 433-443.
- Dunovska, L.; Cajka, T.; Hajslova, J.; Holadova, K. Direct determination of acrylamide in food by gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *578*, 234-240.

Dybing, E.; Farmer, P. B.; Andersen, M.; Fennell, T. R.; Lalljle, S. P. D.; Muller, D. J. G.; Olin, S.; Peterson, B. J.; Schlatter, J.; Scholz, G.; Scimeca, J. A.; Slimani, N.; Törnqvist, M.; Tuijelaars, S.; Verger, P. Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 365-410.

Dybing, E.; Sanner, T. Risk assessment of acrylamide in foods. *Toxicol. Sci.* **2003**, *75*, 7-15.

EFSA, 2005. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the commission related to flavouring group evaluation 13: furfuryl and furan derivatives with and without additional side-chain substituents and heteroatoms from chemical group 14. *EFSA Journal*, **2005a**, *215*, 1-73.

EFSA, 2005. Opinion of EFSA scientific committee on a request of the EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. *EFSA Journal* **2005b**, *282*, 1-30.

EFSA, 2009. Results on the monitoring of acrylamide levels in food. *EFSA Scientific Report* **2009**, *285*, 1-26

EFSA, 2010. Guidance on human health risk-benefit assessment of foods. Scientific opinion. *EFSA Journal* **2010**, *8*, 1673.

EFSA, 2011. Results on acrylamide levels in food from monitoring years 2007-2009 and exposure assessment. Scientific report. *EFSA Journal* **2011**, *9*, 2133.

Erdogdu, S. B.; Palazoglu, T. K.; Gökmen, V.; Senyuva, H. Z.; Ekiz, H. I. Reduction of acrylamide formation in French fries by microwave pre-cooking of potato strips. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 133-137.

Espinosa-Mansilla, A.; Muñoz de la Peña, A.; Salinas F. Semiautomatic determination of furanic aldehydes in food and pharmaceutical samples by a stopped-flow injection analysis method. *J. AOAC Int.* **1993**, *76*, 1255-1261.

EU-OSHA, **2008**. The European Agency for Safety and Health at Work. Exploratory survey of occupational exposure limits for carcinogens, mutagens and reprotoxic substances at EU Member states level.

EURACHEM Guide, **1998**. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics.

European Commission, 2002. Twenty-sixth Commission Directive 2002/34/EC of 15 April 2002 adapting to technical progress Annexes II, III and VI to Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the member states relating to cosmetic products. *Off. J. Eur. Comm.* **2002**, L102/19.

European Commission Recommendation No. 2005/108/EC. *Off. J. Eur. Comm.* **2005**, L34, 43.

European Commission, **2010**. Mandate for standardisation addressed to CEN for methods of analysis for food contaminants;
http://www.cen.eu/cen/Sectors/Sectors/Food/Documents/M_463.pdf

European Commission, **2011**. Commission Recommendation of 10.1.2011 on investigations into the levels of acrylamide in food.

FAO/WHO (Food and Agricultural Organisation/World Health Organisation), **2005**. Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), pp. 1-17.

FAO/WHO (Food and Agricultural Organisation/World Health Organization), **2010**. Summary and conclusions report from seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), pp. 1-16.

Felton, J. S.; Jagerstad, M.; Knize, M. G.; Skog, K.; Wakabayashi, K. Contents in foods, beverages and tobacco. In *Food Borne Carcinogens Heterocyclic Amines*; Nagao, M., Sugimura, T., Eds.; John Wiley & Sons Ltd: West Sussex, U.K., **2000**; pp 31-71.

Fennell, T. R.; Sumner, S. C. J.; Snyder, R. W.; Burgess, J.; Friedman, M. A. Kinetics of elimination of urinary metabolites of acrylamide in humans. *Toxicol. Sci.* **2006**, *93*, 256-267.

Ferreira, A. C.; Reis, S.; Rodrigues, C.; Oliveira, C.; Guedes de Pinho, P. Simultaneous determination of ketoacids and dicarbonyl compounds, key Maillard intermediates on the generation of aged wine aroma. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, S314-S318.

Fredriksson, H.; Tallving, J.; Rosen, J.; Aman, P. Fermentation reduces free asparagine in dough and acrylamide content in bread. *Cereal Chem.* **2004**, *81*, 650-653.

Friedman, M. Chemical basis for biological effects of acrylamide. A review. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4504-4526.

Friedman, M.; Levin, C. E. Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6113-6140.

Garoglio, P. G. Il Corriere Vinicolo, **1961**, *27*, 42.

Gertz, C.; Klostermann, S. Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, *104*, 762-771.

Glatt, H. R.; Sommer, Y.; Health risks by 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. In *Acrylamide and Other Health Hazardous Compounds in Heat-treated Foods*; Skog, K., Alexander, J., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, **2006**; pp 328-357.

Gluguem, H.; Birlouez-Aragon, I. Effects of sterilization, packaging, and storage on vitamin C degradation, protein denaturation, and glycation in fortified milks. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 891-899.

Gökmen, V.; Açar, Ö. C.; Arribas-Lorenzo, G.; Morales, F. J. Investigating the correlation between acrylamide content and browning ratio of model cookies. *J. Food Eng.* **2008**, *87*, 380-385.

Gökmen, V.; Acar, O.; Köksel, H.; Acar, J. Effects of dough formula and baking conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation in cookies. *Food Chem.* **2007**, *104*, 1136-1142.

Gökmen, V.; Kocadagli, T.; Göncüoğlu, N.; Mogol, B. A. Model studies on the role of 5-hydroxymethyl-2-furfural in acrylamide formation from asparagine. *Food Chem.* **2012**, *132*, 168-174.

Gökmen, V.; Mogol, B. A. Computer vision-based image analysis for rapid detection of acrylamide in heated foods. *Qual. Assur. Saf. Crops Foods* **2010**, *2*, 203-207.

Gökmen, V.; Morales, F. J. Hydroxymethylfurfural. In *Encyclopedia of Food Safety (FOSA)*; Elsevier, The Netherlands, **2012**.

Gökmen, V.; Morales, F. J.; Atac, B.; Serpen, A.; Arribas-Lorenzo, G. Multiple-stage extraction strategy for the determination of acrylamide in foods. *J. Food Compos. Anal.* **2009**, *22*, 142-147.

Gökmen, V.; Palazoglu, T. K.; Senyuva, H. Z. Relation between the acrylamide formation and time-temperature history of surface and core regions of French fries. *J. Food Eng.* **2006b**, *77*, 972-976.

Gökmen, V.; Şenyuva, H. Z. Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chem.* **2007**, *103*, 196-203.

Gökmen, V.; Şenyuva, H. Z. Improved method for the determination of hydroxymethylfurfural in baby foods using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2006a**, *54*, 2845-2849.

Gökmen, V.; Şenyuva, H. Z.; Acar, J.; Sarioğlu, K. Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1088*, 193-199.

Graf, M.; Amrein, T. M.; Graf, S.; Szalay, R.; Escher, F.; Amadò, R. Reducing the acrylamide content of a semi-finished biscuit on industrial scale. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **2006**, *39*, 724-728.

Granda, C.; Moreira, R. G.; Tichy, S. E. Reduction of acrylamide formation in potato chips by low-temperature vacuum frying. *J. Food Sci.* **2004**, *69*, 405-411.

Granvogl, M.; Schieberle, P. Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5933-5938.

Granvogl, M.; Schieberle, P. Quantification of 3-aminopropionamide in cocoa, coffee and cereal products. Correlation with acrylamide concentrations determined by an improved clean-up method for complex matrices. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *225*, 857-863.

Greaves, E. O.; Morgan, A. F.; Loveen, M. K. The effect of amino acid supplements and variations in temperature and duration of heating upon the biological value of heated casein. *J. Nutr.* **1938**, *6*, 115-128.

Guía ISO 34:**2000**. Requisitos generales para la competencia de los productores de materiales de referencia.

Guía ISO 35:**2006**. Materiales de referencia - Principios generales y estadísticos para la certificación.

Hadorn, H.; Kovacs, A. S. On the examination and evaluation of foreign bee honey with regards to its hydroxymethylfurfural and diastase content. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters Hyg.* **1960**, *51*, 373-375.

Hagmar, L.; Tornqvist, M.; Nordander, C.; Rosen, I.; Bruze, M.; Kautiainen, A.; Magnusson, A. L.; Malmberg, B.; Aprea, P.; Granath, F.; Axmon, A. Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand. J. Work Environ. Health* **2001**, *27*, 219-226.

Hamlet, C. G.; Sadd, P. A. Effects of yeast stress and pH on 3-monochloropropanediol (3-MCPD)-producing reactions in model dough systems. *Food Addit. Contam.* **2005**, *22*, 616-623.

Hamlet, C. G.; Sadd, P. A. Chloropropanols and their esters in cereal products. *Czech J. Food Sci.* **2004**, *22*, 259-262.

- Hao, R.; Leng, X.; Jing, H. Acrylamide-aurine adducts formation as a key mechanism for aurine's inhibitory effect on acrylamide formation. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 1282-1288.
- Hartmann, E. C.; Boettcher, M. I.; Schettgen, T.; Fromme, H.; Drexler, H.; Angerer, J. Hemoglobin adducts and mercapturic acid excretion of acrylamide and glycidamide in one study population. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6061-6068.
- Health Canada; <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/chem-chim/food-aliment/acrylamide/index-eng.php>
- HEATOX, **2007**. Heat-generated food toxicants: Identification, characterisation and risk minimisation. Lund, Sweden: Lund University; <http://heattox.org/>
- Hedegaard, R. V.; Granby, K.; Franden, H.; Thygesen, J.; Leif, H. S. Acrylamide in bread. Effect of prooxidants and antioxidants. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 519-525.
- Hidalgo, F. J.; Delgado, R. M.; Navarro, J. L.; Zamora, R. Asparagine decarboxylation by lipid oxidation products in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2010a**, *58*, 10512-10517.
- Hidalgo, F. J.; Delgado, R. M.; Zamora, R. Role of mercaptans on acrylamide elimination. *Food Chem.* **2010b**, *122*, 596-601.
- Hidalgo, F. J.; Gallardo, E.; Zamora, R. Strecker type degradation of phenylalanine by 4-hydroxy-2-nonenal in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 10254-10259.
- Hodge, J. E. Dehydrated foods-chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **1953**, *1*, 928-943.
- Hodge, J. E. Origin of flavor in foods: Nonenzymatic browning reactions. In *Chemistry and Physiology of Flavors*; Schultz, H. W., Day, E. A., Libbey, L. M., Eds.; AVI Publishing Company, Inc.: Westport, C.T., **1967**; pp 465-491.
- Hoenicke, K.; Gattermann, R.; Harder, W.; Hartig, L. Analysis of acrylamide in different foodstuffs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *520*, 207-215.
- Hogervorst, J. G. F.; Baars, B. J.; Schouten, L. J.; Konings, E. J. M.; Goldbohm, R. A.; Van den Brandt, P. A. The carcinogenicity of dietary acrylamide intake: A comparative discussion of epidemiological and experimental animal research. *Crit. Rev. Toxicol.* **2010**, *40*, 485-512.
- Hogervorst, J. G.; Schouten, L. J.; Konings, E. J.; Goldbohm, R. A.; Van den Brandt, P. A. Dietary acrylamide intake and the risk of renal cell, bladder, and prostate cancer. *Am. J. Clinical Nut.* **2008**, *87*, 1428-1438.
- Hollnagel, A.; Kroh, L. W. Formation of α -dicarbonyl fragments from mono- and disaccharides under caramelization and Maillard reaction conditions. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1998**, *207*, 50-54.
- Hrdlicka, J. Study of changes occurring during thermic and hydrothermic reactions. Effect of heavy-metals on reaction course of nonenzymic browning. *Sbornik Vysoke Skoly Chemicko-Technologicke V Praze-Potravin* **1976**, *48*, 65-82.
- Hurrel, R. F. Influence of the Maillard reaction on the nutritional value of food. In *The Maillard reaction in food, processing, human nutrition and physiology*; Finot, P. A., Aeshbacher, H. V., Hurrel, K. F., Liardon, K., Eds.; Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag, **1990**.

Husøy, T.; Haugen, M.; Murkovic, M.; Jöbstl, D.; Stølen, L. H.; Bjellaas, T.; Rønningborg, C.; Glatt, H.; Alexander, J. Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 3697-3702.

IARC (International Agency for Research on Cancer), **2010**. World Health Organization. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 92. Some nonheterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures;
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/index.php>.

ISO Guide 34, **2000**. General requirements for the competence of reference materials producers.

ISO Guide 35, **2006**. Reference materials - General and statistical principles for certification.

Jägerstad, M.; Skog, K. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mut. Res.* **2005**, *574*, 156-172.

JECFA, **1996**. Toxicological evaluation of certain food additives. The forty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and contaminants. In WHO Food Additives Series, Vol. 35. Geneva: IFCS, WHO.

JECFA, **2009**. Safety evaluation of certain food additives/prepared by the sixtyninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series, 60, 5.

Jeurings, J.; Kupperts, F. High performance liquid chromatography of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **1980**, *63*, 1215-1218.

Jiao, J.; Zhang, Y.; Ren, Y.; Wu, X.; Zhang, Y. Development of a quantitative method for determination of acrylamide in infant powdered milk and baby foods in jars using isotope dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1099*, 198-202.

JIFSAN /JECFA acrylamide analytical database; <http://acrylamide-food.org/index.htm>

JRC-IRMM, **2006**, Joint Research Centre's Institute for Reference Materials and Measurements. Acrylamide monitoring database;
http://irmm.jrc.ec.europa.eu/activities/acrylamide/Documents/acrylamide_db_310506.pdf

Kanjahn, D.; Jarms, U.; Maier, H. G. Hydroxymethylfurfural and furfural in coffee and related beverages. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **1996**, *92*, 328-331.

Kaplan, O.; Kaya, G.; Ozcan, C.; Ince, M.; Yaman, M. Acrylamide concentrations in grilled foodstuffs of Turkish kitchen by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Microchem. J.* **2009**, *93*, 173-179.

Kawamura, S. Seventy years of the Maillard reaction. In *The Maillard reaction in Food and Nutrition*; Waller, G. R., Feather, M. S., Eds.; American Chemical Society: Washington D.C., **1983**; pp 3-18.

Keeney, M.; Bassette, R. Detection of intermediate compounds in the early stages of browning reaction in milk products. *J. Dairy Sci.* **1959**, *42*, 945-960.

Keramat, J.; LeBail, A.; Prost, C.; Safari, M. Acrylamide in Baking Products: A Review Article. *Food Bioproc. Technol.* **2011**, *4*, 530-543.

Khatami, M.; Suldan, Z.; David, I.; Li, W.; Rocky, J. H. Inhibitory effects of pyridoxal phosphate, ascorbate and aminoguanidine on nonenzymatic glycosylation. *Life Sci.* **1988**, *43*, 1725-1731.

- Kim, B.; Park, S.; Lee, I.; Lim, Y.; Hwang, E.; So, H. Y. Development of a certified reference material for the determination of acrylamide in potato chips. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 1035-1042.
- Kim, C. T.; Hwang, E. S.; Lee, H. J. An improved LC-MS/MS method for the quantitation of acrylamide in processed foods. *Food Chem.* **2007**, *101*, 401-409.
- Kim, H. J.; Richardson, M. Determination of 5-hydroxymethylfurfural by ion-exclusion chromatography with UV detection. *J. Chromatogr. A* **1992**, *593*, 153-156.
- Kolek, E.; Simon, P.; Simko, P. Nonisothermal kinetics of acrylamide elimination and its acceleration by table salt-a model study. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, 341-344.
- Konings, E. J. M.; Hogervorst, J. G. F.; Schouten, L. J.; Brandt, van den Brandt, P. A. Assessing exposure levels of acrylamide. In *Acrylamide and other hazardous compounds in heat-treated foods*; Skog, K., Alexander, J., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, U.K., **2007**; pp 214-230.
- Kotsiou, K.; Tasioula-Margari, M.; Capuano, E.; Fogliano, V. Effect of standard phenolic compounds and olive oil phenolic extracts on acrylamide formation in an emulsion system. *Food Chem.* **2011**, *124*, 242-247.
- Kotsiou, K.; Tasioula-Margari, M.; Kukurová, K.; Ciesarová, Z. Impact of oregano and virgin olive oil phenolic compounds on acrylamide content in a model system and fresh potatoes. *Food Chem.* **2010**, *123*, 1149-1155.
- Koutsidis, G.; Simons, S. P. J.; Thong, Y. H.; Haldou-Pis, Y.; Mojica-Lazaro, J.; Wedzicha, B. L.; Mottram, D. S. Investigations on the effect of amino acids on acrylamide, pyrazines, and Michael addition products in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 9011-9015.
- Koutsidis, G.; De la Fuente, A.; Dimitriou, C.; Kakoulli, A.; Wedzicha, B. L.; Mottram, D. S. Acrylamide and pyrazine formation in model systems containing asparagine. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6105-6112.
- Koyama, N.; Yasui, M.; Oda, Y.; Suzuki, S.; Satoh, T.; Suzuki, T.; Matsuda, T.; Masuda, S.; Kinae, N.; Honma, M. Genotoxicity of acrylamide in vitro: acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. *Environ. Mol. Mutag.* **2011**, *52*, 12-19.
- Kukurova, K.; Morales, F. J.; Bednáriková, A.; Ciesarová, Z. Effect of L-asparaginase on acrylamide mitigation in a fried-dough pastry model. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 1532-1539.
- Lafferty, J. S.; Kamendulis, L. M.; Kaster, J. L.; Jiang, J. Z.; Klaunig, J. E. Subchronic acrylamide treatment induces a tissue-specific increase in DNA synthesis in the rat. *Toxicol. Lett.* **2004**, *154*, 95-103.
- Larsson, S. C.; Akesson, A.; Wolk, A. Long-term dietary acrylamide intake and risk of epithelial ovarian cancer in a prospective cohort of Swedish women. *Cancer Epidemiol. Bio. Prev.* **2009**, *18*, 994-997.
- Lee, H. S.; Rouseff, R. L.; Nagy, S. HPLC determination of furfural and 5-hydroxymethylfurfural in citrus juices. *J. Food Sci.* **1986**, *51*, 1075-1076.
- Lee, M. R.; Chang, L. Y.; Dou, J. Determination of acrylamide in food by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-positive chemical ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *582*, 19-23.

Levine, R. S.; Smith, R. E. Sources of variability of acrylamide levels in cracker model. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4410-4416.

Lindsay, R. C.; Jang, S. **2005**. Methods for suppressing acrylamide formation and restoring browned color and flavor. Patent US20050214411.

Lin, Y.; Lagergren, J.; Lu, Y. Dietary acrylamide intake and risk of esophageal cancer in a population-based case-control study in Sweden. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 676-681.

Lineback, D. R.; Stadler, R. H. Introduction to food process toxicants. In *Process-Induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks*; Stadler, R. H., Lineback, D. R., Eds; John Wiley and Sons, Inc. Ltd: West Sussex, U.K., **2009**; pp 3-19.

Liu, J.; Zhao, G.; Yuan, Y.; Chen, F.; Hu, X. Quantitative analysis of acrylamide in tea by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2008**, *108*, 760-767.

Lo, C. Y.; Li, S.; Wang, Y.; Tan, D.; Pan, M. H.; Sang, S.; Ho, C. T. Reactive dicarbonyl compounds and 5-(hydroxymethyl)-2-furfural in carbonated beverages containing high fructose corn syrup. *Food Chem.* **2008**, *107*, 1099-1105.

Lo Coco, F.; Valentini, C.; Novelli, V.; Ceccon, L. High-performance liquid chromatographic determination of 2-furfuraldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furfuraldehyde in honey. *J. Chromatogr. A* **1996**, *749*, 95-102.

Loeb, A. L.; Anderson, R. J. Antagonism of acrylamide neurotoxicity by supplementation with vitamin B₆. *Neurotoxicol.* **1981**, *2*, 625-633.

LoPachin, R. M. The changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicol.* **2004**, *25*, 617-630.

LoPachin, R. M.; Gavin, T. Acrylamide-induced nerve terminal damage: relevance to neurotoxic and neurodegenerative mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5994-6003.

Maillard, L. C. Action des acides amines sur les sucres: formation des melanodines par voie methodique. *Comptes rendus de l'Académie des sciences* **1912**, *154*, 66-68.

Martins, S.; Jongen, W.; van Boekel, M. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends Food Sci. Technol.* **2001**, *11*, 364-373.

Martins, S.; Van Boekel, M. A kinetic model for the glucose/glycine Maillard reaction pathways. *Food Chem.* **2005**, *90*, 257-269.

Mavric, E.; Wittmann, S.; Barth, G.; Henle, T. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 483-489.

McCollum, E. V.; Davis, M. The cause of the loss of nutritive efficiency of heated milk. *J. Biol. Chem.* **1915**, *23*, 247-254.

Meade, S. J.; Reid, E. A.; Gerrard, J. A. The impact of processing on the nutritional quality of food proteins. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 904-922.

Mestdagh, F.; De Meulenaer, B.; Van Peteghem, C. Influence of oil degradation on the amounts of acrylamide generated in a model system and in French fries. *Food Chem.* **2007**, *100*, 1153-1159.

- Mestdagh, F.; Maertens, J.; Cucu, T.; Delporte K.; Van Peteghem, C.; De Meulenaer, B. Impact of additives to lower the formation of acrylamide in a potato model system through pH reduction and other mechanisms. *Food Chem.* **2008a**, *107*, 26-31.
- Mestdagh, F. J.; de Meulenaer, B.; van Poucke, C.; Detavernier, C.; Cromphout, C.; van Peteghem, C. Influence of oil type on the amounts of acrylamide generated in a model system and in French fries. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6170-6174.
- Mestdagh, F.; Castelein P.; Van Peteghem, C.; De Meulenaer, B. Importance of oil degradation components in the formation of acrylamide in fried foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **2008b**, *56*, 6141-6144.
- Monien, B. H.; Frank, H.; Seidel, A.; Glatt, H. Conversion of the common food constituent 5-hydroxymethylfurfural into a mutagenic and carcinogenic sulfuric acid ester in the mouse in vivo. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1123-1128.
- Monti, S. M.; Ritieni, A.; Sacchi, R.; Skog, K.; Borgen, E.; Fogliano, V. Characterization of phenolic compounds in virgin olive oil and their effect on the formation of carcinogenic/ mutagenic heterocyclic amines in a model system. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3969-3975.
- Montilla-Gómez, J.; Olea-Serrano, F.; García-Villanova, R. Determinación espectrofotométrica de furfural y 5-hidroximetilfurfural al estado de tiosemicarbazonas en vinos tipo Málaga. *Quím. Anal.* **1988**, *7*, 77-84.
- Morales, F. J. Hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. In *Process-Induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks*; Stadler, R. H., Lineback, D. R., Eds.; John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA, **2009**; pp 134-175.
- Morales, F. J.; Açar, Ö. Ç.; Serpen, A.; Arribas-Lorenzo, G.; Gökmen, V. 2007. Degradation of free tryptophan in a cookie model system and its application in commercial samples. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6793-6797.
- Morales, F. J.; Arribas-Lorenzo, G. The formation of potentially harmful compounds in churros, a Spanish fried-dough pastry, as influenced by deep frying conditions. *Food Chem.* **2008**, *109*, 421-425.
- Morales, F.; Capuano, E.; Fogliano, V. Mitigation strategies to reduce acrylamide formation in fried potato products. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2008**, *1126*, 89-100.
- Morales, F. J.; Jiménez-Pérez, S. Hydroxymethylfurfural determination in infant milk-based formulas by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chem.* **2001**, *72*, 525-531.
- Morales, F. J.; Romero, C.; Jiménez-Pérez, S. An enhanced liquid chromatographic method for 5-hydroxymethylfurfural determination in UHT milk. *Chromatogr.* **1992**, *33*, 45-48.
- Morales, F. J.; Somoza, V.; Fogliano, V. Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino Acids* **2012**, *42*, 1097-1109.
- Mottram D. S. Flavour compounds formed during the Maillard reaction. In *Thermally Generated Flavors: Maillard, Microwave and Extrusion Processes*; Parliament, T. H., Morello, M. J., McGorin R.J., Eds.; American Chemical Society: Washington DC, **1994**; pp 104-126.
- Mottram, D. S.; Wedzicha, B. L.; Dodson, A. T. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* **2002**, *419*, 448-449.

Mucci, L. A.; Adami, H. O. The plight of the potato: is dietary acrylamide a risk factor for human cancer?. *J. Nat. Cancer Instit.* **2009**, *101*, 618-621.

Mucci, L. A.; Adami, H. O.; Wolk, A. Prospective study of dietary acrylamide and risk of colorectal cancer among women. *Int. J. Cancer* **2006**, *118*, 169-173.

Mulla, M. Z.; Bharadwaj, V. R.; Annapure, U. S.; Variyar, P. S.; Sharma, A.; Singhal, R. S. Acrylamide content in fried chips prepared from irradiated and non-irradiated stored potatoes. *Food Chem.* **2011**, *127*, 1668-1672.

Murkovic, M.; Bornik, M. A. Formation of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) and 5-hydroxymethyl-2-furoic acid during roasting of coffee. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 390-394.

Murkovic, M.; Pichler, N. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 842-846.

Mustafa, A.; Andersson, R.; Kamai-Eldin, A.; Áman, P. Fortification with free amino acids affects acrylamide content in yeast leavened bread. In *Flour and breads and their fortification in health and disease prevention*; Preedy, V. R., Watson, R. R., Patel, V. B., Eds.; Academic Press, Elsevier, **2011**; pp 325-335.

Nagao, M.; Fujita, Y.; Sugimura, T.; Kosuge, T. Methylglyoxal in beverages and foods: its mutagenicity and carcinogenicity. *IARC Sci. Publ.* **1986**, *70*, 283-291.

Nagaraj, R. H.; Sarkar, P.; Mally, A.; Biemel, K. M.; Lederer, M. O.; Padayatti, P. S. Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats: characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *402*, 110-119.

Napolitano, A.; Morales, F.; Sacchi, R.; Fogliano, V. Relationship between virgin olive oil phenolic compounds and acrylamide formation in fried crisps. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2034-2040.

National Toxicology Program, (NTP), 2008. Toxicology and carcinogenesis studies of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural (CAS No. 67-47-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). National Toxicology Program Tech Report Series; <http://ntp.niehs.nih.gov/>.

Navarro, P.; Aspe, T.; Seiquer, I. Zinc transport in Caco-2 cells and zinc in rats: Influence of the heat treatment of a casein glucose-fructose mixture. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3589-3596.

Nemoto, S.; Takatsuki, S.; Sasaki, K.; Maitani, T. Determination of acrylamide in food by GC/MS using ¹³C-labelled acrylamide as internal standard. *J. Food Hyg. Soc. Jap.* **2002**, *43*, 371-376.

Nicoli, M. C.; Anese, M. A process for removing acrylamid from foods, **2006**. Patent No. PD2006A000332.

Nomeir, A. A.; Silvena, D. M.; McComish, M. F.; Chadwick, M. Comparative metabolism and disposition of furfural and furfuryl alcohol in rats. *Drug Metab. Disp.* **1992**, *20*, 198-204.

O'Brien, J.; Renwick, A. G.; Constable, A.; Dybing, E.; Muller, D. J. G.; Schlatter, J.; Slob, W.; Tueting, W.; van Benthem, J.; Williams, G. M.; Wolfreys, A. Approaches to the risk assessment of genotoxic carcinogens in food: A critical appraisal. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 1613-1635.

OEHHA, Office of Environmental Health Hazard Assessment;
<http://www.oehha.ca.gov/prop65/acrylamide.html>

- Ono, H.; Chuda, Y.; Ohnishi-Kameyama, M.; Yada, H.; Ishizaka, M.; Kobayashi, H.; Yoshida, M. Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods. *Food Addit. Contam.* **2003**, *20*, 215-220.
- Onorato, J. M.; Jenkins, A. J.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation reactions, also inhibits advanced lipoxidation reactions. Mechanism of action of pyridoxamine. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21177-21184.
- Öste, R. E.; Dahlqvist, A.; Sjöstrom, H.; Naren, O.; Miller, R. Effect of Maillard reaction products on protein digestion. In vivo studies. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 355-358.
- Öste, R. E.; Miller, R.; Sjöstrom, H.; Noren, O. Effect of Maillard reaction products on protein digestion. Studies on pure compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 938-944.
- Ou, S.; Shi, J.; Huang, C.; Zhang, G.; Teng, J.; Jiang, Y.; Yang, B. Effect of antioxidants on elimination and formation of acrylamide in model reaction systems. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *182*, 863-868.
- Paleologos, E. K.; Kontominas, M. G. Determination of acrylamide and methacrylamide by normal phase high performance liquid chromatography and UV detection. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1077*, 128-135.
- Pastoriza, S.; Rufián-Henares, J. A.; Morales, F. J. Reactivity of acrylamide with coffee melanoidins in model systems. *LWT - Food Sci. Technol.* **2012**, *45*, 198-203.
- Paulsson, B.; Warholm, M.; Rannug, A.; Törnqvist, M. In vitro studies of the influence of certain enzymes on the detoxification of acrylamide and glycidamide in blood. In *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*; Friedman, M., Mottram, D., Eds.; Springer: New York, **2005**; pp 127-133.
- Pedreschi, F.; Granby, K.; Risum, J. Acrylamide mitigation in potato chips by using NaCl. *Food Biopr. Technol.* **2010**, *3*, 917-921.
- Pedreschi, F.; Kaack, K.; Granby, K.; Troncoso, E. Acrylamide reduction under different pre-treatments in French fries. *J. Food Eng.* **2007**, *79*, 1287-1294.
- Pedreschi, F.; Mariotti, S.; Granby, K.; Risum, J. Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. *LWT-Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 1473-1476.
- Perez-Locas, C.; Yaylayan, V. A. Isotope labeling studies on the formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) from sucrose by pyrolysis-GC/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2008a**, *56*, 6717-6723.
- Perez-Locas, C.; Yaylayan, V. A. Further insight into thermally and pH-induced generation of acrylamide from glucose/asparagine model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2008b**, *56*, 6069-6074.
- Petersen, B. J.; Tran, N. Exposure to acrylamide. Placing exposure in context. In *Chemistry and safety of acrylamide in food*; Friedman, M., Mottram, D., Eds.; New York (NY): Springer Science, **2005**; pp 63-76.
- Porretta, S.; Sandei, L. Determination of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural (HMF) in tomato products: Proposal of a rapid HPLC method and its comparison with the colorimetric method. *Food Chem.* **1991**, *39*, 51-57.
- Quarta, B.; Anese, M. The effect of salts on acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation in glucose-asparagine model solutions and biscuits. *J. Food Nutr. Res.* **2010**, *49*, 69-77.

Rada-Mendoza, M.; Olano, A.; Villamiel, M. Determination of hydroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit-based infant foods. *Food Chem.* **2002**, *79*, 513-516.

Reddy, V. P.; Beyaz, A. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 646-654.

Reglamento (UE) Nº 366/2011 de la Comisión de 14 de abril de 2011 por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), en lo que respecta a su anexo XVII (acrilamida). Diario Oficial de la Unión Europea, **2011**, L 101/12.

Reglamento (CE) Nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006. Diario Oficial de la Unión Europea, **2008**, L353/1.

Reglamento (CE) Nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales. Diario Oficial de la Unión Europea, **2004**, L165.

Rerat, A.; Calmes, R.; Vaissade, P.; Finot, P. A. Nutritional and metabolic consequences of the early Maillard reaction of heat treated milk in the pig. Significance for man. *Eur. J. Nutr.* **2002**, *41*, 1-11.

Reyes-Salas, E. O.; Manzanilla-Cano, J. A.; Barceló-Quintal, M. H.; Juárez-Mendoza, D.; Reyes-Salas, M. Direct electrochemical determination of hydroxymethylfurfural (HMF) and its application to honey samples. *Anal. Lett.* **2006**, *39*, 161-171.

Reynolds, T. Acrylamide and cancer: tunnel leak in Sweden prompted studies. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 876-878.

Rice, J. M. The carcinogenicity of acrylamide. *Mutat. Res.* **2005**, *580*, 3-20.

Rice, R. G.; Keller, G. J.; Kirchner, J. G. Separation and identification of 2,4-dinitrophenylhydrazones of aldehydes and ketones, and 3,5-dinitrobenzoates of alcohols by filter-paper chromatography. *Anal. Chem.* **1951**, *23*, 194-195.

Risner, C. H.; Kiser, M. J.; Dube, M. F. An aqueous high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey and other sugar-containing materials. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, 179-184.

Roach, J. A. G.; Andrzejewski, D.; Gay, M. L.; Nortrup, D.; Musser, S. M. Rugged LC-MS/MS survey analysis for acrylamide in foods. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7547-7554.

Rodríguez-Ramiro, I.; Martín, M. A.; Ramos, S.; Bravo, L.; Goya, L. Olive oil hydroxytyrosol reduces toxicity evoked by acrylamide in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress. *Toxicol.* **2011**, *288*, 43-48.

Roiter, I.; Borovikova, L. A. Level of volatile carbonyl compounds in bread during the addition of enzyme preparations. *Khlebopek. Konditer. Promst* **1972**, *14*, 14-15.

Romani, S.; Bacchiocca, M.; Rocculi, P.; Rosa, M. D. Effect of frying time on acrylamide content and quality aspects of French fries. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *226*, 555-560.

- Rosén, J.; Hellenäs, K. E. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst* **2002**, *127*, 880-882.
- Rufián-Henares, J. A.; de la Cueva, S. P. Assessment of hydroxymethylfurfural intake in the Spanish diet. *Food Addit. Contam.* **2008**, *25*, 1306-1312.
- Rufián-Henares, J. A.; de la Cueva, S. P. Antimicrobial activity of coffee melanoidins: a study of their metal-chelating properties. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 432-438.
- Rufián-Henares, J. A.; Delgado-Andrade, C.; Jimenez-Perez S.; Morales F. J. Assessing nutritional quality of milk-based sport supplements as determined by furosine. *Food Chem.* **2007**, *101*, 573-578.
- Rufián-Henares, J. A., Delgado-Andrade, C.; Morales, F. J. Application of a reverse phase high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of furanic compounds and glucosylisomaltol in breakfast cereals. *J. AOAC Int.* **2006a**, *89*, 1-5.
- Rufián-Henares, J. A.; Delgado-Andrade, C.; Morales, F. J. Relationship between acrylamide and thermal-processing indexes in commercial breakfast cereals: a survey of Spanish breakfast cereals. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006b**, *50*, 756-762.
- Rufián-Henares, J. A.; Morales, F. J. Determination of acrylamide in potato chips by a reversed-phase LC-MS method based on a stable isotope dilution assay. *Food Chem.* **2006**, *97*, 555-562.
- Rufián-Henares, J. A.; Morales F. J. Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Res. Int.* **2007**, *40*, 995-1002.
- Rydberg, P.; Eriksson, S.; Tareke, E.; Karlsson, P.; Ehrenberg, L.; Törnqvist, M. Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7012-7018.
- Sadd, P.; Hamlet, C. The formation of acrylamide in UK cereal products. In *Chemistry and safety of acrylamide in food*; Friedman M., Mottram, D. S. Eds.; Springer: New York, **2005**; pp 415-430.
- Sadd, P.; Hamlet, C. G.; Liang, L. Effectiveness of methods for reducing acrylamide in bakery products. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6154-6161.
- Saison, D.; De Schutter, D. P.; Delvaux, F.; Delvaux, F. R. Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 5061-5068.
- Sang, S.; Shao, X.; Bai, N.; Lo, C. Y.; Yang, C. S.; Ho, C. T. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3 gallate: A new trapping agent of reactive dicarbonyl species. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 1862-1870.
- Sanny, M.; Luning, P. A.; Marcelis, W. J.; Jinap, S.; Van Boekel, M. A. J. S. Impact of control behaviour on unacceptable variation in acrylamide in French fries. *Trends Food Sci. Technol.* **2010**, *21*, 256-267.
- Schettgen, T.; Kütting, B.; Hornig, M.; Beckmann, M. W.; Weiss, T.; Drexler, H.; Angerer J. Trans-placental exposure of neonates to acrylamide-a pilot study. *Int. Arch. Occupat. Environ. Health* **2004**, *77*, 213-216.

Schieberle, P.; Köhler, P.; Granvogl, M. New aspects on the formation and analysis of acrylamide. In *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*; Friedman, M., Mottram, D., Eds.; Springer: New York, **2005**; pp 205-222.

Shipp, A.; Lawrence, G.; Gentry, R.; McDonald, T.; Bartow, H.; Bounds, J.; Macdonald, N.; Clewell, H.; Allen, B.; Van Landingham, C. Acrylamide: Review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Crit. Rev. Toxicol.* **2006**, *36*, 481-608.

Schuck, D. F.; Pavlina, T. M. Rapid detection of 5 - (hydroxymethyl) - 2 - furfural in parenteral solutions with high, performance thin, layer chromatography. *J. Planar Chromatogr.* **1994**, *7*, 242-246.

Seal, C. J.; de Mul, A.; Eisenbrand, G.; Haverkort, A. J.; Franke, K.; Lalljie, S. P.; Mykkänen, H.; Reimerdes, E.; Scholz, G.; Somoza, V.; Tuijelaars, S.; van Boekel, M.; van Klaveren, J.; Wilcockson, S. J.; Wilms, L. Risk-benefit considerations of mitigation measures on acrylamide content of foods-a case study on potatoes, cereals and coffee. *British J. Nutr.* **2008**, *99*, 1-46.

Senyuva, H. Z.; Gökmen, V. Survey of acrylamide in Turkish foods by an in-house validated LC-MS method. *Food Addit. Contam.* **2005**, *22*, 204-209.

Skog, K. I.; Johansson, M. A. E.; Jagerstad, M. I. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: A review on formation, occurrence and intake. *Food Chem. Toxicol.* **1998**, *36*, 879-896.

Skog, K.; Solyakov, A. Heterocyclic amines in poultry products: a literature review. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 1213-1221.

SNFA, Swedish National Food Administration, **2002**. Analysis of acrylamide in food.

Soares, C. M. D.; Alves, R. C.; Casal, S.; Oliveira, M. B. P. P.; Fernandes, J. O. Development and validation of a matrix solid-phase dispersion method to determine acrylamide in coffee and coffee substitutes. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, 57-63.

Soares, C. M. D.; Fernandes, J. O. MSPD method to determine acrylamide in food. *Food Anal. Meth.* **2009**, *2*, 197-203.

Springer, M.; Fischer, T.; Lehrack, A.; Freund, W. Acrylamidbildung in Backwaren. *Getreide, Mehl und Brot* **2003**, *57*, 274-278.

Stadler, R. H. The formation of acrylamide in cereal products and coffee. In *Acrylamide and Other Hazardous Compounds in Heat-Treated Foods*; Skog, K., Alexander, J., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, U.K., **2006**; pp 23-40.

Stadler, R. H.; Blank, I.; Varga, N.; Robert, F.; Hau, J.; Guy, P. A.; Robert, M.-C.; Riediker, S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* **2002**, *419*, 449-450.

Stadler, R. H.; Robert, F.; Riediker, S.; Varga, N.; Davídek, T.; Devaud, S.; Goldmann, T.; Hau, J.; Blank, I. In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5550-5558.

Stadler, R. H.; Verzeegnassi, L.; Varga, N.; Grigorov, M.; Studer, A.; Riediker, S.; Schilter, B. Formation of vinylogous compounds in model Maillard reaction systems. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1242-1250.

Stephens, J. M.; Schlothauer, R. C.; Morris, B. D.; Yang, D.; Fearnley, L.; Greenwood, D. R.; Loomes, K. M. Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys. *Food Chem.* **2010**, *120*, 78-86.

Sugimura, T.; Nagao, M.; Kawachi, T.; Honda, M.; Yahagi, T.; Seino, Y.; Sato, S.; Matsukura, N.; Matsushima, T.; Shirai, A.; Sawamura, M.; Matsumoto, H. Mutagen-carcinogens in foods with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods. In *Origins of human cancer*; Hiatt, H. H., Watson, J. D., Winsten, J. A., Eds.; Cold Spring Harbor: New York, **1977**; pp 1561-1577.

Sumner, S. C. J.; Williams, C. C.; Snyder, R. W.; Krol, W. L.; Asgharian, B.; Fennell, T. R. Acrylamide: A comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure. *Toxicol. Sci.* **2003**, *75*, 260-270.

Surh, Y. J.; Tannenbaum, S. R. Activation of the Maillard reaction product 5-(hydroxymethyl)furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination. *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7*, 313-318.

Svendsen, C.; Husøy, T.; Glatt, H.; Paulsen, J. E.; Alexander, J. 5-Hydroxymethylfurfural and 5-sulfooxymethylfurfural increase adenoma and flat ACF number in the intestine of Min/+ mice. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 1921-1926.

Tareke, E. Identification and origin of potential background carcinogens: Endogenous isoprene and oxiranes, dietary acrylamide. Doctoral thesis, Department of Environmental Chemistry, **2003**, Stockholm University, Sweden.

Tareke, E.; Rydberg, P.; Karlsson, P.; Eriksson, S.; Törnqvist, M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4998-5006.

Tareke, E.; Rydberg, P.; Karlsson, P.; Eriksson, S.; Törnqvist, M. Acrylamide: a cooking carcinogen?. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 517-522.

Tareke, E.; Twaddle, N. C.; McDaniel, L. P.; Churchwell, M. I.; Young, J. F.; Doerge, D. R. Relationships between biomarkers of exposure and toxicokinetics in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice administered single doses of acrylamide and glycidamide and multiple doses of acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *217*, 63-75.

Tateo, F.; Bononi, M.; Gallone, F. Acrylamide content in potato chips on the Italian market determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2010**, *45*, 629-634.

Teixidó, E.; Núñez, O.; Santos, F. J.; Galcerán, M. T. 5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chem.* **2011**, *126*, 1902-1908.

Teixidó, E.; Santos, F. J.; Puignou, L.; Galceran, M. T. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1135*, 85-90.

Theobald, A.; Müller, A.; Anklam, E. Determination of 5-hydroxymethylfurfural in vinegar samples by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1850-1854.

Thornalley, P. J. Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2005**, *1043*, 1-7.

Thornalley, P. J.; Wolff, S.; Crabbe, J.; Stern, A. The autoxidation of glyceraldehyde and other simple

monosaccharides under physiological conditions catalysed by buffer ions. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, 797, 276-287.

Törnqvist, M.; Paulsson, B.; Vikström, A. C.; Granath, F. Approach for cancer risk estimation of acrylamide in food on the basis of animal cancer tests and in vivo dosimetry. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 6004-6012.

UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayos y calibración.

Ulbricht, R. J.; Northup, S. J.; Thomas, J. A. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1984**, 4, 843-853.

U.S. FDA, **2002**. Survey data on acrylamide in food: individual food products; <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/ChemicalContaminants/Acrylamide/default.htm>

U.S. FDA, **2006**. Survey Data on Acrylamide in Food: Individual Food Products; <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/ChemicalContaminants/Acrylamide/default.htm>

U.S. EPA, **1992**. Initial submission: Acute oral LD50 study with 5-hydroxymethylfurfural in rats. Cover letter dated 073192, EPA/OTS. Doc. #88-920005429, Chicago, Illinois, USA.

U.S. EPA, **2002**. United States Environmental Protection Agency. Polycyclic Organic Matter. Environmental Protection Agency, Washington, DC.; <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/polycycl.html>

Van Boekel, M. A. J. S. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnol. Adv.* **2006**, 24, 230-233.

Van Boekel, M.; Fogliano, V.; Pellegrini, N.; Stanton, C.; Scholz, G.; Lalljie, S.; Somoza, S.; Knorr, D.; Rao Jasti, P.; Eisenbrand, G. A review on the beneficial aspects of food processing. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, 54, 1-33.

Van Duin, H. Chromatography by liquid-liquid partition and liquid-liquid interface adsorption. *Nature* **1957**, 180, 1473.

Vattem, D. A.; Shetty, K. Acrylamide in foods: a model for mechanism of formation and its reduction. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2003**, 4, 331-338.

Velíšek, J.; Davídek, J.; Hajšlová, J.; Kubelka, V.; Janíček, G.; Mánková, B. Chlorohydrins in protein hydrolysates. *Zeitsch. Lebensmittel.-Untersuch.-Forsch.* **1978**, 167, 241-244.

Vinci, R. M.; Mestdagh, F.; Van Poucke, C.; Kerkaert, B.; de Muer, N.; Denon, Q.; Van Peteghem, C.; De Meulenaer, B. Implementation of acrylamide mitigation strategies on industrial production of french fries: challenges and pitfalls. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 898-906.

Voziyan, P. A.; Hudson, B. G. Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, 62, 1671-1681.

Voziyan, P. A.; Metz, T. O.; Baynes, J. W.; Hudson, B. G. A post-amadori inhibitor pyridoxamine also inhibits chemical modification of proteins by scavenging carbonyl intermediates of carbohydrate and lipid degradation. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 3397-3403.

- Wang, H.; Lee, A. W. M.; Shuang, S.; Choi, M. M. F. SPE/HPLC/UV studies on acrylamide in deep-fried flour-based indigenous Chinese foods. *Microchem. J.* **2008**, *89*, 90-97.
- Wang, R.; Yang, C.; Song, H. L. Key meat flavour compounds formation mechanism in a glutathione-xylose Maillard reaction. *Food Chem.* **2012**, *131*, 280-285.
- Wilson, K. M.; Mucci, L. A.; Rosner, B. A.; Willett, W. C. Prospective study on dietary acrylamide intake and the risk for breast, endometrial, and ovarian cancers. *Cancer Epidemiol. Bio. Prev.* **2010**, *19*, 2503-2515.
- Winkler, O. Detection and determination of hydroxy-methylfurfural in honey. *Zeitsch. Lebensmitt.* **1955**, *102*, 161-167.
- Wu, J. Y.; Shi, Z. G.; Feng, Y. Q. Determination of 5-Hydroxymethylfurfural using derivatization combined with polymer monolith microextraction by high-Performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3981-3988.
- Xu, X. M.; Ren, Y. P.; Wu, P. G.; Han, J. L.; Shen, X. H. The simultaneous separation and determination of chloropropanols in soy sauce and other flavourings with gas chromatography-mass spectrometry in negative chemical and electron impact ionisation modes. *Food Addit. Contam.* **2006**, *23*, 110-119.
- Yasuhara, A.; Tanaka, Y.; Hengel, M.; Shibamoto, T. Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3999-4003.
- Yaylayan, V. A.; Perez Locas, C.; Wnorowski, A.; O'Brien, J. Mechanistic pathways of formation of acrylamide from different amino acids. In *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*; Friedman, M., Mottram, D. S., Eds.; Springer: New York, **2005**; pp 191-203.
- Yaylayan, V. A.; Stadler, R. H. Acrylamide formation in food: a mechanistic perspective. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 262-267.
- Yaylayan, V. A.; Wnorowski, A.; Perez Locas, C. Why asparagine needs carbohydrate to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1753-1757.
- Ye, H.; Miao, Y.; Zhao, C.; Yuan, Y. Acrylamide and methylglyoxal formation in potato chips by microwaving and frying heating. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 1921-1926.
- Yuan, J. P.; Chen, F. Separation and identification of furanic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography photodiode array detection. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1289-1291.
- Yuan, Y.; Zhao, G. H.; Chen, F.; Liu, J.; Wu, J. H.; Hu, X. S. Correlation of methylglyoxal with acrylamide formation in fructose/asparagine Maillard reaction model system. *Food Chem.* **2008a**, *108*, 885-890.
- Yuan, Y.; Zhao, G. H.; Hu, X. S.; Wu, J. H.; Liu, J.; Chen, F. High correlation of methylglyoxal with acrylamide formation in glucose/asparagine Maillard reaction model. *Eur. Food Res. Technol.* **2008b**, *226*, 1301-1307.
- Yusa, V.; Quintas, G.; Pardo, O.; Marti, P.; Pastor, A. Determination of acrylamide in foods by pressurized fluid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry used for a survey of Spanish cereal-based foods. *Food Addit. Contam.* **2006**, *23*, 237-244.

Zamora, R.; Delgado, R. M.; Hidalgo, F. J. Conversion of 3-aminopropionamide and alkylaminopropionamides into acrylamide in model systems. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 1512-1520.

Zamora, R.; Delgado, R. M.; Hidalgo, F. J. Strecker aldehydes and α -keto acids, produced by carbonyl-amine reactions, contribute to the formation of acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *128*, 465-470.

Zamora, R.; Gallardo, E.; Hidalgo, F. J. Strecker degradation initiated by 2,4-decadienal or methyl 13-oxooctadeca-9,11-dienoate in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1308-1314.

Zamora, R.; Hidalgo, F. J. Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the nonenzymatic food browning. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*, 49-59.

Zamora, R.; Hidalgo, F. J. Contribution of lipid oxidation products to acrylamide formation in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6075-6080.

Zeng, X. H.; Cheng, K. W.; Jiang, Y.; Lin, Z. X.; Shi, J. J.; Ou, S. Y.; Chen, F.; Wang, M. F. Inhibition of acrylamide formation by vitamins in model reactions and fried potato strips. *Food Chem.* **2009**, *116*, 34-39.

Zeng, X. H.; Kong, R. P. W.; Cheng, K. W.; Du, Y. G.; Tang, Y. S.; Chu, I. K.; Lo, C.; Sze, K. H.; Chen, F.; Wang, M. F. Direct trapping of acrylamide as a key mechanism for niacin's inhibitory activity in carcinogenic acrylamide formation. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 802-807.

Zhang, X.; Cao, J.; Jiang, L.; Geng, Ch.; Zhong, L. Protective effect of hydroxytyrosol against acrylamide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells. *Mutat. Res.* **2009**, *664*, 64-68.

Zhang, X. M.; Chan, C. C.; Stamp, D.; Minkin, S.; Archer, M. C.; Bruce, W. R. Initiation and promotion of colonic aberrant crypt foci in rats by 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in thermolyzed sucrose. *Carcinog.* **1993**, *14*, 773-775.

Zhang, Y.; Ren, Y.; Zhao, H.; Zhang, Y. Determination of acrylamide in Chinese traditional carbohydrate-rich foods using gas chromatography with micro-electron capture detector and isotope dilution liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem. Acta* **2007**, *584*, 322-332.

Zhang, Y.; Zhang, Y. Effect of natural antioxidants on kinetic behavior of acrylamide formation and elimination in low moisture asparagine-glucose model system. *J. Food Eng.* **2008**, *85*, 105-115.

Zhang, Y.; Zhang, Y. Formation and reduction of acrylamide in Maillard reaction: A review based on the current state of knowledge. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2007**, *47*, 521-542.

Zhaoyang, L. (2003). Process and apparatus for reducing residual level of acrylamide in heat processed food. US Patent 20030219518-A1.

Zhu, Y.; Li, G.; Duan, Y.; Chen, S.; Zhang, C.; Li, Y. Application of the standard addition method for the determination of acrylamide in heat-processed starchy foods by gas chromatography with electron capture detector. *Food Chem.* **2008**, *109*, 899-908.

Zyzak, D. V.; Sanders, R. A.; Stojanovic, M.; Tallmadge, D. H.; Eberhart, B. L.; Ewald, D. K.; Gruber, D. C.; Morsch, T. R.; Strothers, M. A.; Rizzi, G. P.; Villagran, M. D. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4782-4787.

